



**Universidade de Aveiro**  
**Departamento de Química**

**CAUSAS DE HIPOCROMIA E MICROCITOSE EM DADORES DE SANGUE  
DO CENTRO REGIONAL DE SANGUE DE COIMBRA**

**Mário Luís de Sousa Basto Bogas**



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2009

**Mário Luís de Sousa  
Basto Bogas**

**Causas de hipocromia e microcitose em dadores de  
sangue do Centro Regional de Sangue de Coimbra**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica conjunta da Doutora M. Letícia Ribeiro, MD, PhD, Chefe de Serviço de Hematologia e Directora do Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra e do Professor Doutor Edgar F. Cruz e Silva, Investigador do Centro de Biologia Celular do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

**o júri**

presidente

Prof. Doutora Maria do Rosário Domingues (Presidente)  
Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Leticia Ribeiro (Orientadora)  
Chefe de Serviço de Hematologia e Directora do Departamento de  
Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra

Dr.<sup>a</sup> Celeste Bento (Arguente)  
Unidade de Hematologia Molecular do Hospital Pediátrico de Coimbra

Prof. Doutor Edgar Cruz e Silva (Co-orientador)  
Investigador do Centro de Biologia Celular do Departamento de Biologia da  
Universidade de Aveiro

## Palavras chave

Hipocromia, Microcitose, Talassémias, HbA<sub>2</sub>.

## Resumo

A hemoglobina é um polipeptido em forma de tetrâmero, constituído por um grupo heme e por dois pares de cadeias globínicas  $\alpha$  ( $\zeta$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ) e não- $\alpha$  ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $^A\gamma$ ,  $^G\gamma$ ,  $\epsilon$ ) que se associam em diversas combinações formando diferentes hemoglobinas.

Nos adultos, a principal hemoglobina sintetizada é a HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), contribuindo para cerca de 95% do total da hemoglobina. A restante hemoglobina é constituída por pequenas quantidades de Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) (<3,5%) e de Hb F (<2 %).

As talassémias caracterizam-se por uma produção insuficiente de uma das cadeias globínicas. No adulto a diminuição de síntese de cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$  leva a uma diminuição de produção de HbA resultando numa eritropoiese ineficaz. Nos portadores de talassémia, a hemoglobina (Hb), o volume globular médio (VGM) e a hemoglobina globular médio (HGM) estão abaixo dos valores de referência, tendo em conta a idade e sexo. São designadas por anemias microcíticas e hipocrómicas.

O principal objectivo deste trabalho foi estudar as causas de hipocromia e microcitose num grupo de 50 dadores de sangue do Centro Regional de Sangue de Coimbra.

A principal causa detectada foi a alfa-talassemia, sendo a mutação mais frequente a  $-\alpha^{3.7}$  encontrada em heterozigotia em 10 indivíduos, seguida da variante talassémica Hb Plasencia (4 portadores), da deleção  $-\alpha^{4.2}$  também em heterozigotia (2 casos) e 1 heterozigotia composta  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ . Foram ainda detectadas 4 mutações intrónicas no gene globínico  $\alpha 2$ , não descritas na literatura. Dos restantes, 8 indivíduos eram portadores de  $\beta$ -talassémias e 2 portadores de Hb Lepore.

O conhecimento das causas mais frequentes de hipocromia e microcitose e das respectivas bases moleculares apresenta grandes vantagens em saúde pública, nomeadamente, para a detecção e informação dos portadores e caracterização molecular dos casais de risco. Um acompanhamento adequado em consultas da especialidade e, quando necessário, o diagnóstico pré-natal ajudam a diminuir o número de recém-nascidos afectados com as formas graves das patologias associadas (Talassemia Major/Intermédia e Drepanocitose).

**Key Words**

VGM, HGM, Thalassemia, HbA<sub>2</sub>, Hb F.

**Abstract**

Hemoglobin is a tetramer of polypeptides consisting of a heme group and two pairs of  $\alpha$  globin chains ( $\zeta$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) and non- $\alpha$  globin chains ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $A\gamma$ ,  $G\gamma$ ) that form different hemoglobins types.

The main hemoglobin in adults is the HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), representing about 95% of the total hemoglobin. The remaining hemoglobins consists of small quantities of Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) (<3.5%) and Hb F (<2%).

The thalassemias are due to an insufficient production of globin chains resulting in decrease Hb synthesis and ineffective erythropoiesis. The haemoglobin, mean corpuscular volume (VGM) and mean cell haemoglobin (HGM) are below the reference values for age and sex. This phenotype is called microcytic, hypochromic anaemias.

The main aim of this study is to identify the ethiology of microcytosis and hypochromia in 50 blood donors of the Centro Regional de Sangue de Coimbra.

The principal cause detected was alpha-thalassemia and the most frequent mutation was  $-\alpha^{3.7}$  found in heterozygous state in 10 samples, followed by 8 carriers of  $\beta$ -thalassemia, 4 Hb Plasencia carriers, 2 Hb Lepore carriers, 2  $-\alpha^{4.2}$  heterozygous and 1 compound heterozygous  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ . We also found 4 not previous descibed intronic mutations in the  $\alpha_2$  globin gene.

The knowledge of the most frequent causes of hypocromia and microcytosis, and their molecular bases, has many advantages in public health to define the strategy for carriers detection, the genetic conselling of couples at risk of conceiving fetuses with severe forms of anaemia (Thalassemia Major/Intermedia and Sickle Cell disease), and for prenatal diagnosis.

## Índice Geral

<b>I – Introdução</b>	6
1. Estrutura e Organização do Cluster $\alpha$ e $\beta$	7
2. Classificação das Hemoglobinopatias	9
2.1. Talassémias	9
2.1.1. Classificação das $\beta$ -talassémia	9
2.1.2. Classificação das $\alpha$ -talassémias	11
2.1.2.1. Formas assintomáticas ( $\alpha^+$ )	11
2.1.2.2. Formas assintomáticas ( $\alpha^0$ )	13
2.1.2.3. Formas Graves de $\alpha$ -Talassémia (Doença da HbH e HbBart)	14
2.2. Variantes de Hemoglobina	16
2.2.1. Variantes não talassémicas	16
2.2.2. Variantes Talassémicas	16
2.2.3. Variantes de Hb com alta afinidade para o O <sub>2</sub>	17
2.2.4. Hemoglobinas Instáveis	18
3. Aconselhamento Genético	18
4. Objectivo do trabalho	19
<b>II- Material e Métodos</b>	20
1. Amostras	20
1.1. Colheitas de sangue e parâmetros determinados	20
2. Estudo de Hemoglobinas	21
2.1. HPLC de troca iónica	21
3. Estudos Moleculares	22
3.1. Extracção de DNA	22
3.1.1. Protocolo	22
3.2. Amplificação de DNA pelo método PCR	23
3.3. Electroforese em gel de agarose	23
3.4. GAP-PCR multiplex	24
3.4.1. Protocolo	25
3.5. Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP)	26
3.5.1. Protocolo	26

3.6. Sequenciação dos genes $\alpha 1$ e $\alpha 2$ .....	30
3.6.1. Protocolo .....	31
3.7. Digestão do DNA genómico com enzimas de restrição .....	33
3.7.1. Protocolo .....	34
<b>III- Resultados</b> .....	35
1. Quantificação das HbA <sub>2</sub> e HbF e determinação qualitativa de variantes de Hb por HPLC de troca iónica .....	35
2. Pesquisa das mutações mais comuns por GAP-PCR multiplex .....	36
3. Pesquisa de mutações mais comuns no gene $\beta$ por SSCP.....	39
4. Digestão de produtos de PCR com enzimas de restrição .....	39
5. Pesquisa das mutações pontuais nos genes $\alpha$ globínicos por sequenciação .....	41
<b>IV- Discussão</b> .....	45
<b>V- Conclusão</b> .....	49
<b>VI- Bibliografia</b> .....	50

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Resumo da sequência dos primers utilizados para a pesquisa das mutações $\alpha^{3.7}$ e $\alpha^{4.2}$ pela técnica GAP-PCR multiplex .....	24
<b>Tabela 2.</b> Composição da reacção de amplificação PCR para o GAP-PCR multiplex..	25
<b>Tabela 3.</b> Resumo do programa utilizado no sequenciador para a técnica GAP-PCR multiplex .....	25
<b>Tabela 4.</b> Composição da reacção de amplificação PCR do exão 1 do gene $\beta$ -globínico.....	26
<b>Tabela 5.</b> Resumo da sequência dos primers utilizados para a amplificação do exão 1 do gene $\beta$ .....	26
<b>Tabela 6.</b> Resumo do programa utilizado no sequenciador para a amplificação do exão 1 do gene $\beta$ -globínico.....	27
<b>Tabela 7.</b> Composição do gel de separação para a técnica SSCP .....	27
<b>Tabela 8.</b> Composição da solução polimerizante para a técnica SSCP .....	27
<b>Tabela 9.</b> Preparação do gel de empacamento para a técnica SSCP .....	28
<b>Tabela 10.</b> Preparação do nitrato de prata para a técnica SSCP .....	29
<b>Tabela 11.</b> Preparação do reagente de sódio para a técnica SSCP .....	29
<b>Tabela 12.</b> Resumo da sequência de primers utilizados para a sequenciação dos genes globínicos $\alpha 1$ e $\alpha 2$ .....	31
<b>Tabela 13.</b> Composição da reacção de amplificação dos genes globínicos $\alpha 1$ e $\alpha 2$ .....	31
<b>Tabela 14.</b> Resumo do programa utilizado no termociclador para a amplificação dos genes globínicos $\alpha 2$ e $\alpha 1$ .....	31
<b>Tabela 15.</b> Composição da reacção de sequenciação dos genes $\alpha$ -globínicos.....	32
<b>Tabela 16.</b> Resumo do programa utilizado no sequenciador para a reacção de sequenciação .....	32
<b>Tabela 17.</b> Parâmetros hematológicos e resultado do estudo de Hbs das amostras do Grupo I .....	35
<b>Tabela 18.</b> Parâmetros hematológicos e resultados das amostras pertencentes ao Grupo II .....	37
<b>Tabela 19.</b> Parâmetros hematológicos e resultado do perfil das hemoglobinas das amostras que pertencem ao Grupo III .....	38
<b>Tabela 20.</b> Parâmetros hematológicos e resultado do perfil das hemoglobinas das amostras que pertencem ao Grupo IV .....	38



<b>Tabela 21.</b> Parâmetros hematológicos das amostras pertencentes ao grupo IV portadores de uma Hb Plasencia .....	40
<b>Tabela 22.</b> Parâmetros hematológicos dos indivíduos que evidenciaram mutações por sequenciação .....	44
<b>Tabela 23.</b> Parâmetros hematológicos dos 4 indivíduos em que não foram encontradas nenhuma mutação .....	44

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação dos diferentes tipos de Hbs predominantes durante o desenvolvimento humano, desde o estado embrionário ao estado adulto .....	6
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do cluster $\alpha$ e $\beta$ .....	7
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do cluster $\alpha$ -globínico com a posição relativa dos 4 elementos regulatórios .....	8
<b>Figura 4.</b> Representação dos crossingovers que dão origem às duas formas mais comuns de $\alpha^+$ -talassémia .....	12
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do <i>cluster</i> de genes $\alpha$ -globínicos e das mutações $\alpha^+$ mais comuns .....	13
<b>Figura 6.</b> Delecções que causam $\alpha^0$ -talassemia .....	14
<b>Figura 7.</b> Visualização dos corpos de inclusão de HbH .....	15
<b>Figura 8.</b> Variant II Biorad Laboratories <sup>®</sup> .....	21
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do <i>cluster</i> $\alpha$ -globínico com a indicação das 2 delecções estudadas e a posição relativa de cada primer utilizado na reacção GAP-PCR multiplex .....	24
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática das posições relativas dos <i>primers</i> utilizados para a sequenciação dos genes globínicos $\alpha_2$ e $\alpha_1$ .....	30
<b>Figura 11.</b> Resultados do PCR multiplex em gel de agarose a 1,5% .....	36
<b>Figura 12.</b> Resultados do SSCP para a pesquisa da mutação mais comum do gene $\beta$ (IVSI-6) .....	39
<b>Figura 13.</b> Resultados da digestão do produto PCR com a enzimas de restrição MspI .....	40
<b>Figura 14.</b> Representação parcial da sequenciação do gene $\alpha_2$ da amostra IV.1 .....	41
<b>Figura 15.</b> Representação parcial da sequenciação do gene $\alpha_2$ da amostra IV.2 .....	41
<b>Figura 16.</b> Representação parcial da sequenciação do gene $\alpha_2$ da amostra IV.9 .....	42
<b>Figura 17.</b> Representação parcial da sequenciação do gene $\alpha_2$ da amostra IV.11 .....	42
<b>Figura 18.</b> Resultados da digestão do produto PCR com a enzima de restrição DdeI .....	43
<b>Figura 19.</b> Resultados da digestão do produto PCR com a enzima de restrição AluI .....	43

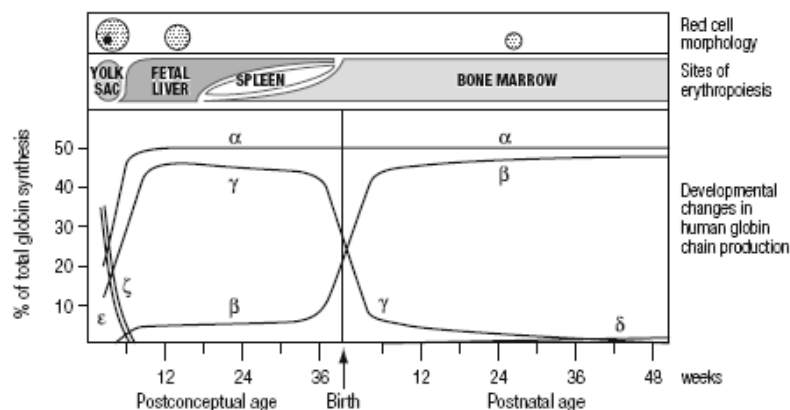
## I - Introdução

A hemoglobina (Hb) é uma proteína presente nos glóbulos vermelhos e cuja principal função é o transporte de oxigénio e CO<sub>2</sub>.

É constituída por duas partes: A parte proteica constituída por quatro cadeias globínicas que se agrupam formando um tetrâmero e o grupo heme que contém uma molécula de ferro.

As cadeias globínicas são compostas por 2 cadeias  $\alpha$  ( $\zeta$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) e por 2 cadeias não  $\alpha$  ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) cujos genes estão localizados em diferentes cromossomas (16 e 11 respectivamente), que se juntam em diversas combinações durante os vários estágios do desenvolvimento intra uterino formando diferentes hemoglobinas (Hbs) (Fig.1).

Figura 1. Representação dos diferentes tipos de Hbs predominantes durante o desenvolvimento humano, desde o estado embrionário ao estado adulto. Adaptado de Wood et al. (1993) [1].



Durante o período embrionário os genes globínicos  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\alpha$ , expressos a partir da 3ª semana de gestação, emparelham-se formando as hemoglobinas Gower I ( $\zeta\epsilon_2$ ), Gower II ( $\alpha\epsilon_2$ ), Portland I ( $\zeta_2\gamma_2$ ) e a HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ).

A partir da 8ª semana de gestação, a síntese das cadeias  $\epsilon$  e  $\zeta$  praticamente cessam a sua transcrição, enquanto as cadeias  $\gamma$  iniciam a sua síntese. Durante este período, e até ao nascimento, a HbF é o principal responsável pelo transporte de oxigénio e ao nascimento a HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) está presente em quantidades inferiores a 10%.

Após o nascimento, ocorre a substituição gradual das cadeias  $\gamma$  por as cadeias  $\beta$ . As cadeias  $\delta$  são sintetizadas em pequenas quantidades e formam a HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ).

Num indivíduo adulto 95% do total da hemoglobina é HbA, sendo a restante hemoglobina constituída por 2-3% de HbA<sub>2</sub> e 1-2% de HbF.

## 1. Estrutura e Organização do Cluster $\alpha$ e $\beta$

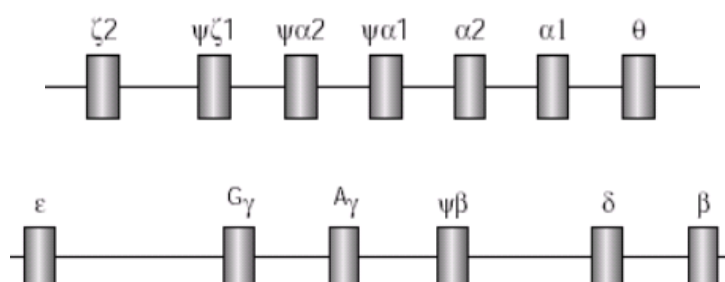
Os genes que codificam as cadeias globínicas estão organizados em complexos multigênicos denominados *clusters*, organizados pela ordem em que são expressos (Figura 2).

Estes *clusters* são o resultado de múltiplos eventos, que ocorreram há cerca de 500 milhões de anos atrás [2].

O *cluster*  $\beta$  está localizado no braço curto do cromossoma 11 no telomero p15.5 e é constituído por 5 genes funcionais ( $\epsilon$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\delta$ - $\beta$ ) e um pseudogene ( $\psi\beta$ ) [3]. Os dois genes  $\gamma$  ( $A\gamma$  e  $G\gamma$ ) são altamente homólogos e codificam cadeias que diferem entre si em apenas um aminoácido na posição 136 ( $G\gamma$  guanina,  $A\gamma$  alanina). Os genes  $\delta$  e  $\beta$  também são similares entre si, as respectivas cadeias diferem em apenas 10 aminoácidos [4].

O *cluster*  $\alpha$  está localizado no cromossoma 16, no telomero p13.3 e possui três genes funcionais ( $\zeta$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ ), três pseudogenes ( $\psi\zeta1$ ,  $\psi\alpha_2$ ,  $\psi\alpha_1$ ), e dois genes inativos ( $\theta_1$  e  $\mu$ ). [5] [6]

Figura 2. Representação esquemática do cluster  $\alpha$  e  $\beta$  Adaptado de Weatherall *et al* (2000) [7]



Os genes  $\alpha_1$  (HBA1 OMIM:141800) e  $\alpha_2$  (HBA2 OMIM:141850) são altamente homólogos (83% de homologia), codificam proteínas idênticas [8] e diferem apenas no segundo intrão (IVS-II) e nas regiões 3' transcritas mas não traduzidas (3'UTR) [9].

O *cluster* é altamente polimórfico, com muitas mutações pontuais e rearranjos que não têm efeito aparente na expressão dos genes [10]. Possui também 4 regiões hipervariáveis, uma a jusante do gene  $\alpha_1$  (3'HVR  $\alpha$ -globínica) [11], uma entre os genes

$\xi_2$  e  $\psi\xi_1$  (HVR interzeta), uma no primeiro intrão de ambos os genes  $\xi$  (HVR's  $\xi$ -intrão) [12] [13] e uma a 5' do *cluster* (5'HVR  $\alpha$ -globínica) [14].

A montante do gene  $\xi$ , estão descritos 4 elementos regulatórios designados por HS-10, HS-33, HS-40 e HS-48 de acordo com a distância em kb do gene embrionário (Figura 3) [15].

Figura 3. Representação esquemática do cluster  $\alpha$ -globínico com a posição relativa dos 4 elementos regulatórios. Adaptado de Voon HPJ et al (2008) [16].



Foi demonstrado que o mais importante elemento regulatório da expressão do gene  $\alpha$  é o HS-40, necessário para a normal expressão dos genes globínicos  $\alpha$ , que actua como potenciador da síntese dos genes  $\alpha$  [17] [18] [19].

Esta região regulatória consiste num segmento com 200 a 300 pb, numa região de cromatina aberta quer em células eritróides quer em não eritróides e contém locais de ligação para uma variedade de factores *trans-acting* eritroides (GATA-1 e NF-E2). [20] [21] [22].

Baseado na quantificação do mRNA foi calculado que gene  $\alpha_2$  sintetiza 2 a 3 vezes mais cadeias que o  $\alpha_1$ , enquanto o gene  $\alpha_1$  é 2 a 3 vezes mais eficaz na tradução, resultando numa síntese equilibrada das cadeias  $\alpha$ -globínicas pelos dois genes [23] [24].

## **2. Classificação das Hemoglobinopatias**

As hemoglobinopatias são classificadas em dois grupos: as estruturais e as de síntese. As estruturais são caracterizadas por alterações na sequência de aminoácidos das cadeias globínicas, resultando na presença de uma hemoglobina anormal, podendo também ser designadas por variantes de hemoglobina. As hemoglobinas de síntese ou talassémias são devidas à redução ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias globínicas.

### **2.1. Talassémias**

A primeira indicação de talassémia surgiu em 1925, quando um pediatra de Detroit, Thomas Cooley, descreveu uma síndrome numa criança descendente de italianos, caracterizada por anemia profunda, esplenomegalia e deformações ósseas [25].

As talassémias caracterizam-se por uma redução ou ausência de cadeias globínicas e que são classificadas de acordo com a cadeia afectada. As clinicamente mais significativas são as  $\alpha$  e as  $\beta$ , não só pela sua grande prevalência a nível mundial, mas também pela sua gravidade fenotípica.

Devem-se essencialmente a uma produção insuficiente de HbA resultando numa ineficaz eritropoiese, com parâmetros hematológicos de volume globular médio (VGM) e de hemoglobina globular médio (HGM) abaixo dos valores de referência. Esta redução do VGM e da HGM são designadas respectivamente por microcitose e hipocromia.

#### **2.1.1. Classificação das $\beta$ -talassémia**

As  $\beta$ -talassémias são caracterizadas por uma redução ou ausência de síntese das cadeias  $\beta$ . Esta redução leva a uma produção insuficiente de HbA e a um aumento das outras hemoglobinas que constituem a Hb no adulto, nomeadamente a HbA<sub>2</sub> e a HbF.

Consoante a gravidade do fenótipo podem ser classificadas em 3 grupos: minor, intermédia e major.

A  $\beta$ -talassémia minor é devida à presença de uma mutação em heterozigotia nas cadeias globínicas  $\beta$ . São portadores assintomáticos caracterizados por uma HbA<sub>2</sub>

aumentada e uma HbF normal ou aumentada. Apresentam uma anemia moderada, hipocrômica e microcítica, com valores de HGM inferior a 27 pg e VGM inferior a 80fl. O rácio de cadeias  $\alpha/\beta$  situa-se entre os 1,5 e os 2 (normal:0,9-1,1) [26].

Estão descritas algumas  $\beta$ -talassémias minor, que apresentam valores normais de HbA<sub>2</sub> e de HbF, denominadas por “ $\beta$ -talassémias silenciosas”. São caracterizadas por um ligeiro desequilíbrio da síntese das cadeias  $\beta$  [27].

A  $\beta$ -talassémia intermédia engloba um vasto espectro de fenótipos não dependentes de transfusões. Apresentam valores de Hb moderadamente baixos ou no limite inferior da normalidade (6-10 g/dL) e os principais sintomas são a anemia, a icterícia e a esplenomegalia. Distinguem-se das  $\beta$ -talassémia major por não serem dependentes de transfusões.

A  $\beta$ -talassémia major é a forma mais grave da doença e é quase exclusivamente sintetizada HbF. A HbA<sub>2</sub> está presente em quantidades muito variáveis.

Clinicamente manifesta-se por volta do 6º mês de vida. Os sintomas caracterizam-se por uma anemia severa, hipocromia e microcitose com anisocitose extrema. A anemia produz uma situação de *stress* na medula óssea, com síntese de HbF em quantidades insuficientes para prevenir a anemia.

Necessitam de transfusões para manter os níveis de Hb aceitáveis, assim como, para diminuir a eritropoiese anormal provocada pelo excesso de cadeias  $\alpha$ . Sem transfusões ocorre a morte prematura entre os 3 e os 4 anos de idade com aumento do tamanho do fígado e do baço, trombocitopenia e leucopenia.

As  $\beta$ -talassémias podem ainda ser classificadas de acordo com o tipo de mutações no gene  $\beta$ -globínico. Nas  $\beta^+$  há uma diminuição da síntese das cadeias  $\beta$ -globínicas ( $\beta^+$ ) enquanto nas  $\beta^0$  há ausência total de síntese.

A mais prevalente na zona centro de Portugal é a mutação  $\beta^+$  IVSI-6 (T-C),  $\beta^0$  CD39 (CAG-TAG),  $\beta^0$  CD15 (TGG-TGA),  $\beta^0$  IVSI-1 (G-A) e a  $\beta^0$  IVSI-110 (G-A) [28].

### 2.1.2. Classificação das $\alpha$ -talassémias

Cada indivíduo normal tem 2 genes  $\alpha$  funcionais ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) em cada cromossoma 16, resultando num genótipo ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ). Na  $\alpha$ -talassémia há inactivação de um ou mais genes das cadeias  $\alpha$ -globínicas. Esta redução faz diminuir a percentagem de HbA, assim como a de HbA<sub>2</sub> e de HbF, embora não em quantidades significativas.

De acordo com o número de deleções que envolvem os genes  $\alpha$ -globínicos, as  $\alpha$ -talassémias podem ser classificadas em quatro formas diferentes:  $\alpha^+$ ,  $\alpha^0$ , Doença da Hb H e Hb Bart.

As clinicamente menos significativas são as  $\alpha^+$  e  $\alpha^0$ , também designadas por formas assintomáticas, porque envolvem uma deleção ou mutação talassémica de 1 ou de 2 genes globínicos, resultando respectivamente num genótipo ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) e ( $--/\alpha\alpha$ ).

As formas mais graves são a doença da Hb H e a Hb Bart. A deleção de 3 e de 4 genes  $\alpha$ , leva à formação de um tetramero  $\beta$  ( $\beta_4$ ) e  $\gamma$  ( $\gamma_4$ ).

### 2.1.3. Formas assintomáticas ( $\alpha^+$ )

Os indivíduos com 3 genes  $\alpha$  normais, são portadores assintomáticos com valores normais de hemoglobina, mas apresentam microcitose e hipocromia nos limites inferiores da normalidade. Apresentam um rácio de síntese de cadeias  $\alpha/\beta$  *in vitro* que se situa entre os 0,8-0,9 (normal: 0,9-1,1) [29].

Durante o período neonatal apresentam quantidades reduzidas de HbBart ( $\gamma$ ) entre os 1 e os 2%. [30]

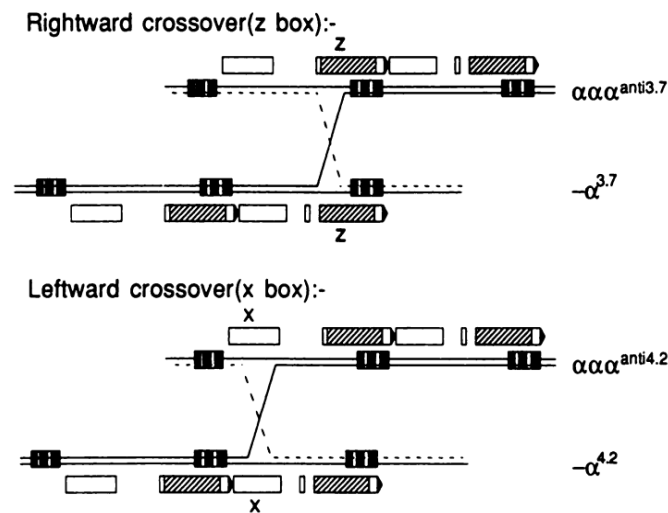
Em Portugal, as deleções mais comuns associadas com o fenotipo  $\alpha^+$ -tal são as deleções  $-\alpha^{3.7}$  e a  $-\alpha^{4.2}$  em que o cromossoma fica só com um gene híbrido  $\alpha_2\alpha_1$  e o outro com 3 genes  $\alpha$  ( $\alpha_2, \alpha_1\alpha_2, \alpha_1$ ) [31].



Os produtos  $-\alpha^{3.7}$  podem ser divididos em elementos não homologos do tipo I, II, III, pela localização exacta da recombinação na caixa Z. Recombinações não homologas entre as caixas X também originam um alelo com só com um gene  $\alpha$  ( $-\alpha^{4.2}$ , deleção à esquerda) e outro com três genes  $\alpha$  ( $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti-4.2}}$ ) [32] (Figura 4).

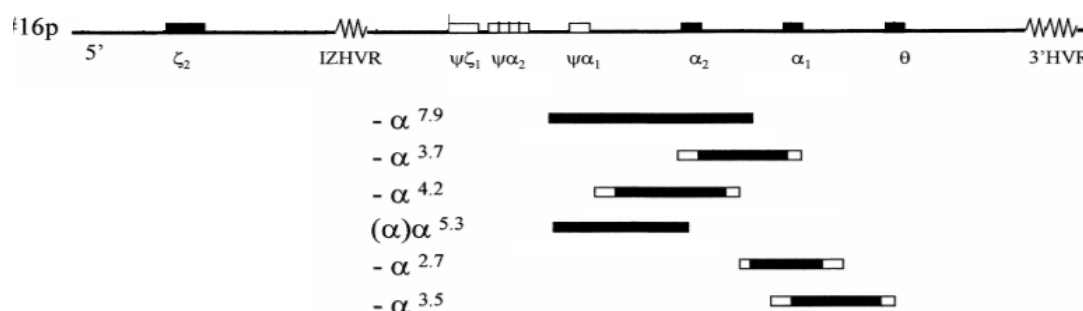
Eventos posteriores de recombinação entre os cromossomas resultantes ( $\alpha, \alpha\alpha, \alpha\alpha\alpha$ ) dão origem a genes  $\alpha$  quadruplicados ( $\alpha\alpha\alpha\alpha^{\text{anti 3.7}}$ ), ( $\alpha\alpha\alpha\alpha^{\text{anti 4.2}}$ ) ou a outros arranjos mais raros [33].

Figura 4. Representação dos crossingovers que dão origem às duas formas mais comuns de  $\alpha^+$ -talassémia. Adaptado de Higgs (1989) [32].



A figura 5 mostra a representação esquemática do cluster  $\alpha$ -globínico, assim como, algumas deleções raras que produzem o fenotipo  $\alpha^+$ .

Figura 5. Representação esquemática do *cluster* de genes  $\alpha$ -globínicos e das mutações  $\alpha^+$  mais comuns. Os genes estão indicados como caixas negras e os pseudogenes como caixas brancas. As deleções que afectam um dos genes  $\alpha$  estão indicadas nas barras negras. As porções brancas das barras indicam que os *breakpoints* exactos não são conhecidos. Adaptado de Harteveld *et al* (2003) [37]).



A deleção  $-\alpha^{3.5}$  remove completamente o gene  $\alpha_1$  e as suas regiões flangeadoras [34]; a deleção  $-\alpha^{5.3}$  tem o *breakpoint* 5' localizado 822 pb a montante do *Cap site* do gene  $\psi\alpha_1$  e o *breakpoint* 3' no IVS-I do gene  $\alpha_2$  [35]; uma deleção rara, removendo o gene  $\alpha_1$  ( $-\alpha^{2.7}$ ), foi descrita num doente chinês com doença da HbH [36]. A deleção  $-\alpha^{7.9}$  é a segunda deleção  $\alpha^+$ -talassémica na qual o *breakpoint* 5' se localiza na região intergénica entre os genes  $\psi\alpha_2$ - e  $\psi\alpha_1$ -globínicos. Esta deleção sugere um evento de recombinação não homólogo e foi detectada em duas famílias Indianas não relacionadas [37].

#### 2.1.4. Formas assintomáticas ( $\alpha^0$ )

A  $\alpha^0$ -tal resulta de mutações ou deleções dos dois genes  $\alpha$ -globínicos no mesmo cromossoma [38] produzindo um genótipo ( $--/\alpha\alpha$ ). Os portadores apresentam uma anemia ligeira, com microcitose (VGM 70-80 fL) e uma hipocromia (HGM 20-25pg) significativas com uma diminuição do rácio de síntese de cadeias  $\alpha/\beta$  *in vitro* para 0,5-0,7 (normal 0,9-1,1) [39].

No período neonatal apresentam quantidades significativas de HbBart (3-8%) que desaparece por volta do 6 mês de vida [38].

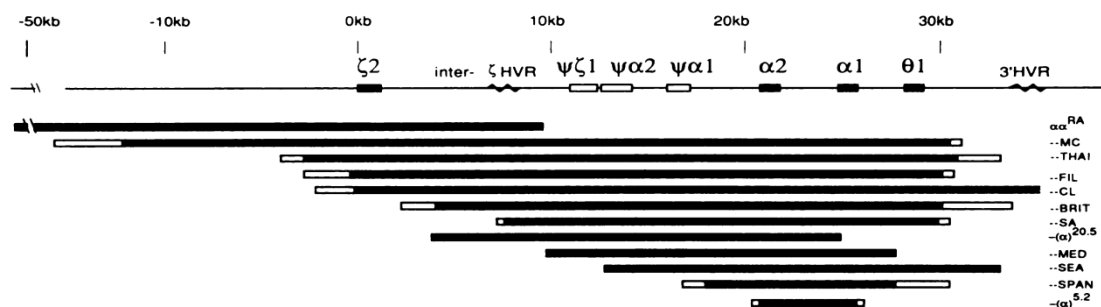
Nestes casos, os progenitores também apresentam uma hipocromia e microcitose.

Os homozigóticos para esta condição, apresentam hipdropsia fetal da Hb Bart ( $\gamma_4$ ), originando morte fetal [40], contudo quando em heterozigotia apresentam um desenvolvimento normal.

As deleções mais comuns são a ( $--^{SEA}$ ) no Sudoeste Asiático e no Mediterrâneo as deleções ( $--^{MED}$ ) e  $-(\alpha)^{20.5}$ . A deleção ( $--^{SEA}$ ) abrange aproximadamente uma região de 20 kb e remove os genes globínicos  $\psi\alpha_2$ ,  $\psi\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ , e  $\theta_1$  [41]. O *breakpoint* 5' para a deleção ( $--^{MED}$ ) está localizado a 5' do  $\psi\zeta_1$ , e o *breakpoint* 3' imediatamente a 5' do  $\theta_1$ . [42]

A deleção  $-(\alpha)^{20.5}$  remove uma região de 20.5 Kb, que se estende da zona 5' do  $\psi\zeta_1$  até ao CD 51 do gene globínico  $\alpha_1$  [43].

Figura 6. Deleções que causam  $\alpha^0$ -talassemia. No *cluster*  $\alpha$ -globínico os genes estão representados em caixas a negro e os pseudogenes em caixas brancas. A extensão das deleções é mostrada em barras sólidas, com as regiões de *breakpoints* mal definidos em caixas abertas. Adaptado de Higgs *et al* (1993) [5].



### 2.1.5. Formas Graves de $\alpha$ -Talassemia (Doença da HbH e HbBart)

Na Hb Bart há uma deleção de 4 genes  $\alpha$  ( $--/--$ ) que leva à formação de um tetrâmero  $\gamma$  ( $\gamma_4$ ). É uma forma incompatível com a vida [44] [45] em que a Hb predominante é a HbBart ( $\gamma$ ) com cerca de 97%, sendo a restante Hb constituída por Hbs embrionárias. O feto morre prematuramente ou nas primeiras horas após um nascimento prematuro com edemas generalizados, ascites, hepatoesplenomegalia, baço aumentado e anemia severa [46].

O esfregaço sanguíneo periférico apresenta eritroblastose severa, anisocitose, macrócitos grandes e hipocromicos e policromasia.

Os valores hematológicos apresentam uma HGM muito baixo e um VGM entre os 90 e os 110 fl (VR>140 fl).

A doença da HbH corresponde a uma deleção de 3 genes  $\alpha$ , produzindo um genótipo ( $--/\alpha$ ), e apresenta manifestações clínicas associadas a uma anemia hemolítica moderada com um desenvolvimento e uma esperança de vida normal. É muito frequente nos países Asiáticos e não requer transfusões regulares de sangue [47]. A ausência dos 3 genes  $\alpha$  leva à formação de um tetrâmero  $\beta$  ( $\beta_4$ ).

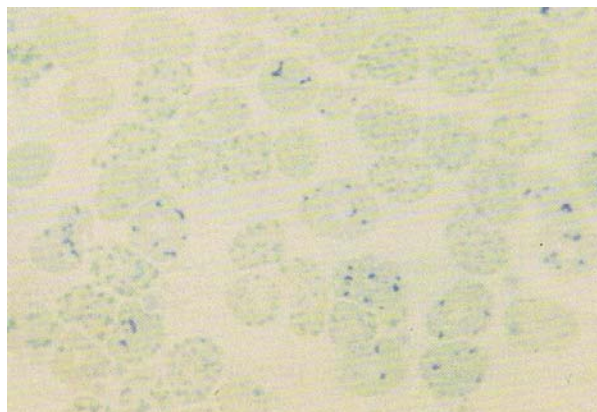
Apresentam valores de Hb entre os 2,6 e os 13,3 g/dL (VR:12,5-18 g/dL) [5], reticulocitose moderada, hipocromia entre os 60-65 pg (VR: 78-90 pg) e microcitose severa entre os 17-21fl (VR:27-32). O rácio das cadeias  $\alpha/\beta$  é de 0,3 e os 0,5 [48] (VR:0,9-1,1).

O nível de Hb Bart ao nascimento varia entre os 15 e os 30%, substituído durante o desenvolvimento humano pela HbH (0.8-40%). Os pacientes chegam à vida adulta sem precisarem de transfusões.

A anemia normalmente torna-se mais severa durante a gravidez, infecções e após a ingestão de fármacos oxidantes que aumentam a oxidação e precipitação da HbH [49].

Podem ser encontrados glóbulos vermelhos com corpos de inclusão de Hb H, que se detectam após incubação com azul de cresil brilhante [50] (Figura 7).

Figura 7. Visualização dos corpos de inclusão de HbH



Os tetrâmeros  $\beta$  ao contrário dos tetrâmeros  $\gamma$  são mais instáveis precipitando na membrana do glóbulo vermelho alterando-a formando corpos de inclusão. Estes dois tetrâmeros apresentam alta afinidade para o oxigénio [7].

## 2.2. Variantes de Hemoglobina

As variantes de Hb resultam de mutações pontuais nos genes nas regiões codificantes dos genes globínicos que levam a uma substituição de um aminoácido. O fenótipo depende do tipo de mutação e da sua localização na cadeia globínica afectada. Podem ser classificadas em 4 tipos: variantes não talassémicas, variantes talassémicas, variantes com alta afinidade para o O<sub>2</sub> e variantes de Hb instáveis.

### 2.2.1. Variantes não talassémicas

A forma mais comum em Portugal é a HbS ( $\beta_6$  Glu-Val) [28]. Consiste numa substituição do aminoácido glutamina na posição 6 da cadeia  $\beta$  por uma valina (GAG→GTG). A alteração do aminoácido leva a ligeira alteração no tetrâmero de Hb ( $\alpha_2\beta^S_2$ ) com alteração da solubilidade da Hb formada (Hb S) [51]. Em heterozigotia estes indivíduos são assintomáticos e apresentam HGM e VGM normais enquanto em homozigotia (Depranocitose) são caracterizados por anemia hemolítica crónica [29].

Existem também outros casos descritos com elevada prevalência em Portugal como a HbC ( $\beta_6$  Glu-Lis) Hb Cocody ( $\beta_{21}$  Asp→Asn) e a Hb D-Punjab ( $\beta_{121}$  Glu→Gln) [28].

### 2.2.2. Variantes Talassémicas

As variantes talassémicas caracterizam-se por mutações nas cadeias globínicas que originam uma variante de hemoglobina com um fenótipo talassémico. São caracterizadas por uma anemia hipocrómica e microcítica mas com valores normais de HbA<sub>2</sub> e uma HbF normal ou aumentada. As mais frequentes são a Hb E ( $\beta_{26}$  Glu-Lis), Hb Lepore ( $\delta\beta$ -talassémia), Hb Constant Spring ( $\alpha_2$  TAA→CAA) e a Hb Plasencia ( $\alpha_{125}$  Leu-Arg).

A Hb Lepore é uma  $\delta\beta$ -talassémia [52]. Deve-se essencialmente a uma mutação na transição da expressão dos genes  $\delta$  para  $\beta$  que origina uma recombinação anormal com formação de uma cadeia híbrida  $\delta\beta$  e 2 cadeias  $\alpha$  normais.

Em heterozigotia apresentam parâmetros hematológicos similares à  $\beta$ -talassémia menor, mas com uma HbA<sub>2</sub> normal e uma HbF aumentada (2 a 5%) e 10 a 20% de Hb Lepore. Em homozigotia apenas apresentam HbF e Hb Lepore (25-30%) e com um fenótipo semelhante à  $\beta$ -talassémia intermédia [53] [54].

Em Portugal, a variante de Hb mais frequente relacionada com as cadeias  $\alpha$  é a Hb Plasencia ( $\alpha_{2125}$  Leu-Arg) [28] [55] caracterizada por uma microcitose e uma hipocromia moderadas. Esta mutação deve-se a uma substituição de um nucleotídeo no codão 125 do gene  $\alpha 2$  que codifica uma arginina em vez de uma leucina.

A Hb Constant Spring ( $\alpha_2$ TAA→CAA) é muito prevalente na população Asiática e corresponde a mutação não deleccional dos genes globínicos  $\alpha$  [56]. É codificada no gene  $\alpha 2$  e resulta de uma mutação pontual que leva a alteração do codão de terminação. Esta mutação altera o codão Stop TAA na posição 142 em CAA que codifica uma glutamina e origina um alongamento da cadeia  $\alpha$  em 31 aminoácidos. Esta hemoglobina precipita na membrana do glóbulo vermelho. Este efeito tóxico causa uma anemia hemolítica e uma eritropoiese ineficaz.

### **2.2.3. Variantes de Hb com alta afinidade para o O<sub>2</sub>**

Algumas variantes de Hb estão associadas com um aumento da afinidade para o O<sub>2</sub> e clinicamente resultam numa hipoxia e numa eritropoiese ineficaz. Estas mutações devem-se a mutações nas regiões cruciais para a estabilidade e função da Hb e estão associadas a um aumento do número de glóbulos vermelhos.

Em Portugal estão descritas duas hemoglobinopatias relacionadas com um aumento da afinidade do O<sub>2</sub>, designadas por Hb Coimbra ( $\beta_{99}$  Asp-Glu) [57] e a Hb Vila Real ( $\beta_{36}$  Pro-His) [58].

A Hb Coimbra resulta numa substituição no codão 99 do gene  $\beta$  globínico (GAT→GAA) resultando numa substituição de um ácido aspartico por uma glutamina.

A Hb Vila Real corresponde a uma mutação na segunda posição do codão 36 do gene globínico  $\beta$  resultando numa troca de uma citosina por uma timina (CCT→CAT) que codifica uma histidina em vez de uma prolina.

#### 2.2.4. Hemoglobinas Instáveis

Devem-se a substituições de aminoácidos nas regiões sensíveis da molécula da Hb, fundamentais para a sua estabilidade e viabilidade fisiológica.

As Hb instáveis desnaturam e precipitam dentro do glóbulo vermelho sendo destruídas prematuramente pelo sistema reticulo-endotelial diminuindo a sua semi-vida e originando um quadro clínico de anemia hemolítica crónica. A severidade fenotípica depende do grau de instabilidade da Hb mas raramente dependem de transfusões.

Em Portugal a mais frequente é a Hb Koln ( $\beta_{98}$  Val $\rightarrow$ Met) [28] que resulta de uma substituição do aminoácido valina por uma metionina na posição 98 das cadeias  $\beta$ . Caracteriza-se por apresentar uma HGM baixa e um VGM normal.

Em Portugal estão descritas, entre outras, 2 Hb Instáveis, a Hb Génova ( $\beta_{28}$  Leu $\rightarrow$ Pro) e a Hb Sabine ( $\beta_{91}$  Leu $\rightarrow$ Pro) [28].

### 3. Aconselhamento Genético

As formas graves de  $\alpha$ -talassémia, Doença da Hb H e Hb Barts, são herdadas de um modo autossómico recessivo. Em Países com alta prevalência de  $\alpha$ -talassémia é importante oferecer um aconselhamento genético aos portadores de modo a estarem conscientes dos riscos de uma concepção.

Qualquer indivíduo que apresente um VGM e HGM baixos na ausência de anemia sideropénica deve ser considerado como portador de talassémia.

Em Portugal, o rastreio é realizado por HPLC de troca iónica de uma forma sistemática e gratuita no Departamento de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra, em amostras colhidas em capilares.

Este método, identifica as variantes de hemoglobina mais importantes e quantifica as HbA<sub>2</sub> e HbF. É particularmente indicado para o rastreio a nível nacional de portadores de hemoglobinopatias, pois a colheita de amostras é fácil e o transporte por correio até ao laboratório mantém os resultados fiáveis [59].

No rastreio das hemoglobinopatias para se ter a certeza de um diagnóstico, deve-se ter como base os valores hematológicos (Hb, VGM, HGM) e ter em atenção que algumas variantes de Hb são electroforeticamente silenciosas. Nestes casos, se a suspeita for grande é necessário fazer o estudo molecular.

#### **4. Objectivo do trabalho**

O objectivo deste trabalho é estudar as causas de hipocromia e microcitose num grupo de amostras de indivíduos assintomáticos, após exclusão de anemia sideropénica por doseamento da ferritina.

O conhecimento das bases moleculares das amostras hipocrómicas e microcíticas e a sua prevalência na população, apresenta grandes vantagens em termos de saúde pública, como meio para planificar estratégias para a diminuição do número de recém-nascidos afectados com formas graves, através de consultas de aconselhamento genético e se for necessário o diagnóstico pré-natal.



## **II- Material e Métodos**

### **1. Amostras**

Foram investigadas 50 amostras de doadores de sangue da região centro de Portugal (27 do sexo masculino e 23 do sexo feminino), com idades compreendidas entre os 18 e os 60 anos, considerados clinicamente aptos para a dádiva de sangue, segundo o procedimento interno do Centro Regional de Sangue de Coimbra.

Apresentavam valores de Hb, VGM e de HGM abaixo dos valores de referência, e foi excluída anemia sideropenica através do doseamento da ferritina.

Essas amostras foram posteriormente estudadas no Laboratório de Anemias Congénitas e Hematologia Molecular do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar de Coimbra (CHC), onde foi realizado o estudo de hemoglobinas e o estudo molecular dos genes das cadeias globínicas  $\alpha$  e  $\beta$ .

#### **1.1. Colheitas de sangue e parâmetros determinados**

As amostras de sangue foram colhidas em tubos de EDTAk<sub>3</sub> durante as brigadas móveis realizadas na região centro de Portugal, e enviadas para o Centro Regional de Sangue de Coimbra, de acordo com os critérios de recepção e acondicionamento de amostras estabelecido pela instituição.

Os parâmetros hematológicos foram obtidos através de um contador automático de células (CELL-DYN Sapphire<sup>®</sup>).

As amostras foram guardadas a 2-8°C até ao seu processamento e envio para o Laboratório de Anemias Congénitas e Hematologia Molecular do Centro Hospitalar de Coimbra.

## 2. Estudo de Hemoglobinas

Todas as amostras formam processadas por HPLC de troca iónica para doseamento da Hb A, HbA<sub>2</sub> e HbF, e identificação e quantificação de variantes.

A investigação molecular foi efectuada, após extração de DNA, por técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), seguidas de GAP-PCR multiplex, sequenciação dos genes globínicos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  e SSCP de parte do gene globínico  $\beta$ .

### 2.1. HPLC de troca iónica

Para determinar a percentagem de Hb A<sub>2</sub> e de Hb F presente em cada amostra, foi utilizado o equipamento HPLC-Variant II da Biorad Laboratories® usando o programa  $\beta$ -thal Short Program – Biorad®. É um sistema fechado de HPLC, totalmente automático, utilizado na quantificação das HbA<sub>2</sub> e HbF e determinação qualitativa e quantitativa de variantes de hemoglobina.

As amostras são diluídas na Variant II Sampling Station e injectadas na coluna analítica. As bombas duplas da Variant II Chromatographic Station proporcionam à coluna um gradiente de tampão de crescente força iónica. Na coluna, as diferentes Hbs são separadas com base nas respectivas interacções iónicas com o material da coluna. As Hbs separadas, passam então pela célula de fluxo do fotómetro de filtros, onde se medem as alterações de absorvância a 415nm. Um filtro adicional de 690nm corrige a absorvância de fundo.

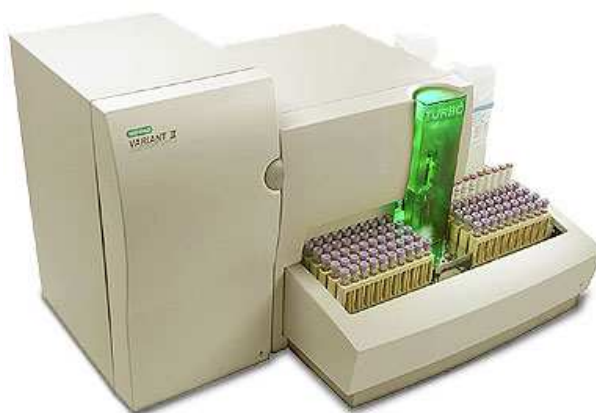


Figura 8. HPLC-Variant II da Biorad Laboratories®. Utilizado na quantificação das HbA<sub>2</sub> e HbF e determinação qualitativa e quantitativa de variantes de hemoglobina.

### **3. Estudos Moleculares**

#### **3.1. Extracção de DNA**

Na extracção de DNA utilizam-se substâncias desproteinizantes, que têm como finalidade desnaturar e retirar as proteínas acopladas à molécula de DNA.

A extracção de DNA foi efectuada a partir de sangue total, após lise das membranas celulares pela enzima Proteínase K, utilizando um sistema de membranas de sílica que absorvem o DNA, permitindo assim isolar os ácidos nucleicos dos restantes componentes citoplasmáticos e/ou nucleares intracelulares. As concentrações salinas utilizadas durante todo o processo e o respectivo pH asseguram que as proteínas e os outros contaminantes não fiquem retidos na membrana. A lavagem destas membranas é essencial, uma vez que a sua eficiência contribui para a pureza do DNA obtido.

O DNA é extraído da fracção leucocitária, pois são os únicos componentes figurados do sangue com núcleo.

##### **3.1.1. Protocolo**

Foi utilizado o Kit GE Healthcare® para a extracção de DNA segundo este protocolo:

1. Adicionar 20µl de Proteínase K para um eppendorf de 1,5ml.
2. Adicionar 200µl de sangue total e 400µl de Solução de Lise.
3. Misturar no vortex.
4. Incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente.
5. Efectuar uma centrifugação rápida.
6. Transferir a amostra para uma coluna com um tubo colector.
7. Centrifugar durante 1 minuto a 11000x g.
8. Dispensar o eluado.
9. Adicionar 500µl de Solução de Lise.
10. Centrifugar durante 1 minuto a 11000x g.
11. Dispensar o eluado.
12. Adicionar 500µl de Solução de Lavagem.

13. Centrifugar durante 3 minutos a 11000x g.
14. Dispensar o eluado.
15. Mudar o tubo colector.
16. Adicionar 200µl de Elution Buffer pré-aquecido a 70°C.
17. Incubar durante 1 minuto à temperatura ambiente.
18. Centrifugar durante 1 minuto a 11000x g.
19. Guardar o eluado a 2-8°C.

### **3.2. Amplificação de DNA pelo método PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Esta técnica tem como principal objectivo a obtenção de múltiplas cópias de um fragmento específico de DNA. O PCR permite-nos obter quantidade do fragmento de DNA que queremos estudar por técnicas como o SSCP, a sequenciação, GAP-PCR multiplex ou digestão com enzimas de restrição.

### **3.3. Electroforese em gel de agarose**

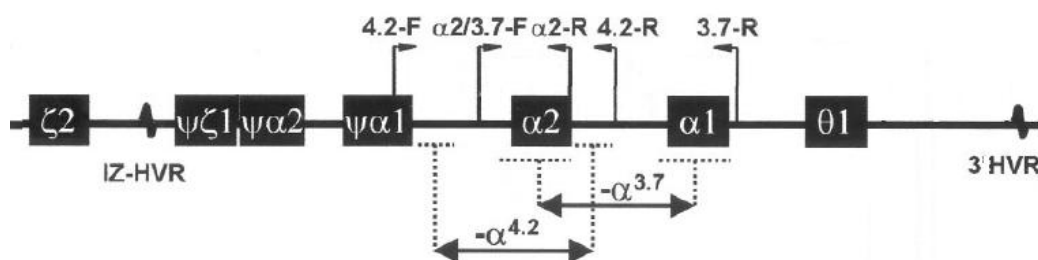
A visualização dos produtos de PCR é feita por electroforese em gel de agarose. O gel de agarose prepara-se dissolvendo, com aquecimento, uma suspensão de agarose numa solução tampão de TBE 0.5x (Tris 1,78M; EDTA 0,04M; Ácido Bórico 1,77M) com adição de brometo de etídio e deixando solidificar num molde apropriado onde se coloca previamente um pente. Obtém-se um gel contendo uma fileira de poços numa das extremidades, onde posteriormente serão colocadas as amostras a analisar. As amostras dos produtos de PCR são colocadas nos poços do gel com um corante e após a aplicação de um campo eléctrico, vão migrar para o pólo positivo (ânodo), uma vez que os ácidos nucleicos têm carga negativa em pH neutro.

### 3.4. GAP-PCR multiplex

Esta técnica baseia-se no procedimento descrito por Tan et al (2001) [60]. Através de uma única reacção de PCR pesquisam-se as duas deleções  $\alpha^+$  comuns em Portugal ( $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ ). Os primers descritos são das zonas flangeadoras e o tamanho de cada fragmento é diferente para cada deleção.

A representação esquemática da estratégia adoptada para a análise da reacção GAP-PCR multiplex encontra-se representada na figura 9.

Figura 9. Representação esquemática do *cluster* de genes  $\alpha$ -globínicos, com a indicação das extensões das 2 deleções estudadas e a posição relativa dos primers utilizados para a reacção GAP-PCR multiplex. Adaptado de: Chong SS et al (2001) [61].



Os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados para cada deleção estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo da sequência dos primers utilizados para a pesquisa das mutações  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  pela técnica GAP-PCR multiplex.

Primer	Sequência oligonucleotídica (5'→3')	Concentração ( $\mu$ M)	Tamanho do fragmento (pb)
$\alpha 2/3.7$ -F	CCC CTC GCC AAG TCC ACC C	0,2	Fragmento junção $-\alpha^{3.7}$ (2022/2029)
$\alpha 2$ -R	AGA CCA GGA AGG GCC GGT G	0,2	Gene $\alpha_2$ (1800)
4.2-F	GGT TTA CCC ATG TGG TGC CTC	0,5	
4.2-R	CCC GTT GGA TCT TCT CAT TTC CC	0,5	Fragmento junção $-\alpha^{4.2}$ (1628)

### 3.4.1. Protocolo

#### A. Reacção de amplificação de DNA

Para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , adicionar os seguintes componentes para tubos de PCR de 0,2 mL:

Tabela 2. Composição da reacção de amplificação PCR para o GAP-PCR multiplex.

	Quantidade ( $\mu\text{L}$ )	Concentração
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	11.75	-
dNTP's	3	200 mM
Q- Solution (Qiagen <sup>®</sup> )	5	1x
Tampão (Qiagen <sup>®</sup> )	2.5	1.5 mM
HotStar Taq polymerase (Qiagen <sup>®</sup> )	0.2	2,5 U
Primers	2	Tabela II.2
DNA	0.5	-

Foi utilizado o seguinte programa no termociclador Biometra<sup>®</sup> conforme descrito na Tabela 3:

Tabela 3. Resumo do programa utilizado no termociclador para a técnica GAP-PCR multiplex.

Temperatura	Tempo	Número ciclos
96°C	15 min	1
96°C	45 seg	35
60°C	90 seg	
72°C	135 seg	
72°C	5 min	1

Para visualizar a amplificação, realizou-se uma electroforese das amostras (5 $\mu\text{L}$  produto PCR) num gel de agarose (Neurobio Agarose Standard<sup>®</sup>) de 1,5% com tampão TBE 1x a 120v durante 2 horas e 30 minutos.

### 3.5 Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP)

A detecção de mutações por análise de polimorfismos conformacionais de DNA baseia-se nas diferentes conformações que segmentos de DNA de cadeia simples (ssDNA), resultantes da desnaturação de produtos de PCR adquirem pela substituição de uma ou mais bases. As diferenças de conformação podem ser detectadas por alteração da migração desses segmentos de DNA quando sujeitos a electroforese em gel de poliacrilamida. O resultado é visualizado por coloração com nitrato de prata. A sensibilidade e simplicidade do método faz com que seja usado para análise de um grande número de amostras e para a detecção de polimorfismos conhecidos, por comparação com amostras anteriormente caracterizadas [62].

#### 3.5.1 Protocolo

##### A. Reacção de amplificação do exão 1 do gene $\beta$ globínico

Para um volume final de 50  $\mu$ L, adicionar os seguintes componentes para tubos de PCR de 0,2 mL conforme descrito na Tabela 4:

Tabela 4. Resumo da composição da reacção de amplificação PCR do exão 1 do gene  $\beta$ -globínico.

	Quantidade ( $\mu$ L)	Concentração
H <sub>2</sub> O	42	-
dNTP's	1	10 mM
Buffer (Qiagen <sup>®</sup> )	5	
HotStar Taq polymerase (Qiagen <sup>®</sup> )	0.2	2,5 U
Primers	2	0,2 $\mu$ M
DNA	2	-

Os primers utilizados para a amplificação do 1 exão do gene  $\beta$  estão descritos na Tabela 5:

Tabela 5. Resumo da sequência dos primers utilizados para a amplificação do exão 1 do gene  $\beta$ .

Primer	Sequência oligonucleotídica (5'→3')
16D	ACC TCA CCC TGT GGA GCC ACA
38R	GGG CCT ATG ATA GGG

Foi utilizado o seguinte programa no termociclador Biometra®:

Tabela 6. Resumo do programa utilizado no termociclador para a amplificação do exão 1 do gene  $\beta$ -globínico.

Temperatura	Tempo	Número ciclos
95°C	5 min	1
94°C	45 seg	30
54°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1

Para testar a amplificação, realizou-se uma electroforese das amostras (adição de 8 $\mu$ L) num gel de agarose de 1,0% com tampão TEB 0.5x a 115v durante 15 minutos.

## B. Preparação de gel de separação

1. Pipetar para um tubo de 15 mL os seguintes reagentes:

Tabela 7. Composição do gel de separação para a técnica SSCP.

Composição	Quantidades (mL)
Água destilada	5.5
TBE 10X	0.5
Acrilamida 40% (Quantum Appligene®)	3
Glicerina (Gibco Brl, Life Technology®)	1.140

2. Misturar e guardar 1,5 ml desta mistura para a preparação do gel de empacamento (Solução A).
3. Adicionar a solução polimerizante à mistura:

Tabela 8. Composição da solução polimerizante para a técnica SSCP.

Composição	Quantidade ( $\mu$ L)
Persulfato de amónio 25%	16
TEMED (Sigma®)	10

4. Pipetar para cada conjunto de vidros de electroforese vertical já montado.
5. Cobrir com água destilada e deixar polimerizar.



### C. Preparação de gel de empacamento

1. Adicionar à solução anterior previamente guardada as seguintes soluções polimerizantes:

Tabela 9. Preparação do gel de empacamento para a técnica SSCP.

Composição	Quantidade
Solução anterior (A)	1.5 mL
Persulfato de amónio 10%	8 µL
TEMED (Sigma®)	5 µL

2. Antes de pipetar o gel de empacamento deve retirar a água que cobre o gel de separação.
3. Pipetar o gel de empacamento por cima do gel de separação.
4. Colocar os pentes e deixar polimerizar.

### D. Preparação das amostras

1. 4 µL de produto de PCR e 4 µL da solução comercial Stop Solution.
2. Desnaturar 5 minutos a 90°C no termociclador Biometra®.
3. Depois de desnaturadas, as amostras devem ser colocadas no gelo até serem aplicadas.

### E. Electroforese

1. Aplicar 8 µL da amostra previamente preparada
2. Deixar correr a electroforese durante 16 horas a 80v.
3. Após electroforese, corar o gel pela técnica de coloração de nitrato de prata.

## F. Preparação da Coloração de Nitrato de Prata

1. Colocar o gel em 100 ml de ácido acético 10%.
2. Incubar à temperatura ambiente durante 20 minutos com agitação.
3. Lavar com água destilada 3x durante 2 minutos.
4. Adicionar 100 mL de reagente de prata.

Tabela 10. Preparação do nitrato de prata para a técnica SSCP.

Reagente	Quantidade
Nitrato de Prata 1% (Duchef <sup>®</sup> )	1 g
Água destilada	100 mL
Formaldeído 37%	150 µL

5. Incubar à temperatura ambiente com agitação durante 30 minutos.
6. Rejeitar o nitrato de prata.
7. Lavar 2x durante 30 segundos com água destilada.
8. Juntar 100 mL de reagente de sódio (Tabela 11) e agitar até visualizar as bandas.

Tabela 11. Preparação do reagente de sódio para a técnica SSCP.

Reagente	Quantidade (µL)	Concentração
Carbonato de Sódio (Merck <sup>®</sup> )	200	0,05 M
Formaldeído	300 µL	37%
Tiosulfato de Sódio	40	10 mg/mL

9. Rejeitar o reagente de prata e juntar 100 mL de reagente de sódio.
10. Adicionar 100 mL de ácido acético a 10% quando as bandas forem bem visíveis.
11. Registrar e fotografar os resultados.

### 3.6 Sequenciação dos genes $\alpha 1$ e $\alpha 2$

Os genes globínicos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  foram amplificados utilizando o mesmo primer directo para os dois genes e primers reversos específicos para cada gene de acordo com a Tabela 12. A posição relativa de cada primer está descrita na Figura 10.

Figura 10. Representação esquemática das posições relativas dos *primers* utilizados para a sequenciação dos genes globínicos  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ .

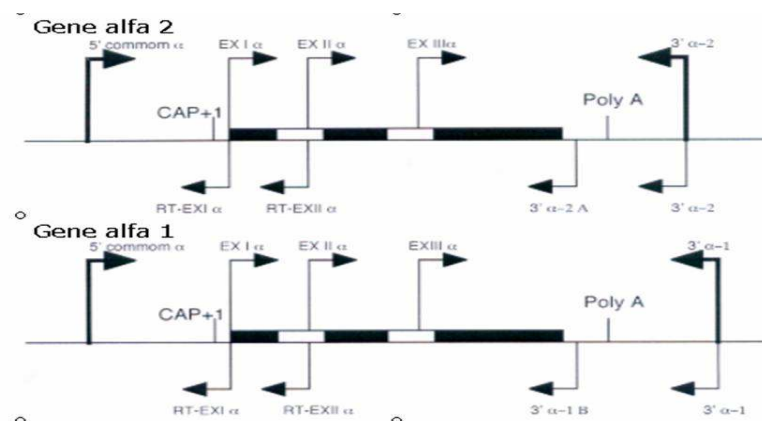


Tabela 12. Resumo da sequência de primers utilizados para a sequenciação dos genes globínicos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ .

<i>Primer</i>	<b>Sequência oligonucleotídica (5'→3')</b>
5' comum $\alpha$	GGG GTG CAC GAG CCG ACA GC
3' $\alpha 2$	CTC TCA GGA CAG GGG ATG GTT CAG
3' $\alpha 1$	AAC CTG CAT TGA ATC TGA AAA GTC
3' $\alpha$ -2A	TTA TTC AAA GAC CAG GAA GGG CCG
3' $\alpha$ -1B	CGC CCA CTC AGA CTT TAT TCA AAG
EX I $\alpha$	TCC CCA CAG ACT CAG AGA GAA C
EX II $\alpha$	ATG TTC CTG TCC TTC CCC AC
EX III $\alpha$	AGT TCC TGG CTT CTG TGA GC
RT-EX I $\alpha$	GTG GGT TCT CTC TGA GTC TGT
RT-EX II $\alpha$	TGT GGG TCC GGG CGG G

### 3.6.1 Protocolo

#### A. Reacção de amplificação de DNA

Para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , adicionar os seguintes componentes para tubos de PCR de 0,2  $\mu\text{L}$ :

Tabela 13. Resumo da composição da reacção de amplificação dos genes globínicos  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ .

	Quantidade ( $\mu\text{L}$ )	Concentração
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	28.4	-
d NTP	0,8	10 mM
Q- Solution (Qiagen <sup>®</sup> )	10	5x
Buffer (Qiagen <sup>®</sup> )	5	10x
HotStar taq platinum (Invitrogen <sup>®</sup> )	0,2	2,5 U
Primers	2	2 $\mu\text{L}$
DNA	2	-

Foi utilizado o seguinte programa no termociclador biometra<sup>®</sup>:

Tabela 14. Resumo do programa utilizado no termociclador para a amplificação dos genes globínicos  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ .

Temperatura	Tempo	Número ciclos
95°C	3 min	1
95°C	1 min	35
65°C	1 min	
72°C	135 seg	
72°C	5 min	1

Para testar a amplificação de cada fragmento, realizou-se uma electroforese das amostras (aplicação de 5  $\mu\text{L}$  do produto de PCR) num gel de agarose a 1 % em tampão TBE 1% a 115V durante 15 minutos.

## B. Purificação das amostras

1. Utilizar 1 µL de exosap (USB<sup>®</sup>) e 4µL de produto de PCR
2. Colocar no termociclador durante 15 minutos a 37°C e mais 15 minutos a 80°C.

## C. Reacção de Sequenciação

A preparação da amostra para a sequenciação automática, inicia-se pela reacção de sequenciação. Para tal, foi utilizado uma mistura comercial (Big Dye) à qual se adiciona o produto de PCR previamente purificado e um dos primers. Esta mistura comercial possui dNTPs e ddNTPs marcados com 4 fluorocromos diferentes, tampão e DNA polimerase.

Tabela 15.Composição da reacção de sequenciação dos genes  $\alpha$ -globínicos.

	Quantidade (µL)	Concentração
H2O	3	-
Big Dye (Applied Biosystems <sup>®</sup> )	4	-
Primer	1,6	2 µL
Pcr purificado	8	-

Foi utilizado o seguinte programa de PCR:

Tabela 16. Resumo do programa utilizado no termociclador para a reacção de sequenciação.

Temperatura	Tempo	Número ciclos
96°C	3 min	1
96°C	10 seg	25
50°C	5 seg	
60°C	4 min	
60°C	10 min	1

#### **D. Reacção de Precipitação pelo Kit Qiagen<sup>®</sup> (Dye Ex<sup>TM</sup> 2.0 spin kit)**

Esta reacção de purificação tem como finalidade a remoção do produto comercial Big Dye, tendo como fim enviar a amostra purificada para o sequenciador.

1. Resuspender a resina na coluna por vortex ligeiro
2. Aliviar a tampa e partir a cápsula de baixo
3. Centrífugar 3 minutos a 3000 rpm
4. Marcar eppendorfs de 1,5mL
5. Rejeitar os microtubos e colocar a colunas no eppendorf
6. Aplicar todo produto de PCR
7. Centrífugar 5 min a 3000 rpm
9. Hidratar com formaldeído até perfazer os 20  $\mu$ L.

#### **3.7 Digestão do DNA genómico com enzimas de restrição**

As enzimas de restrição têm a capacidade de cortar e reconhecer sequências específicas de DNA de cadeia dupla. Essa capacidade leva à criação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos que podem ser visualizados por luz ultravioleta.

Foram utilizadas 3 enzimas de restrição, a MspI (New England Biolabs<sup>®</sup>), DdeI (Promega Madison<sup>®</sup> Wi USA) e a AluI (Amersham Pharmacia<sup>®</sup>).

A digestão de um fragmento do gene  $\alpha 2$  com a enzima MspI foi utilizada para confirmar a presença da mutação no codão 125 (CTG→CGG) característica da Hb Plasencia.

A digestão com as enzimas DdeI e AluI foi utilizada para confirmar respectivamente as mutações IVSII-55 (T→G) e IVSII-142 (G→A) no segundo intrão do gene  $\alpha 2$ .

### **3.7.1 Protocolo**

#### **A. Digestão com enzimas de restrição**

Em reacções separadas, foi digerido um fragmento previamente amplificado do gene  $\alpha 2$ -globínico com as enzimas MspI (20U/  $\mu$ L), DdeI (10U/  $\mu$ L) e AluI (1U/ $\mu$ L) durante 16h a 37°C. As reacções ocorreram numa concentração 5U/  $\mu$ L num tampão apropriado para cada enzima e 15  $\mu$ L de produto de PCR, perfazendo um volume total de 30  $\mu$ L.

Os fragmentos digeridos foram separados por electroforese em gel de agarose a 3% durante 30 minutos, corados com brometo de etídio e visualizados por luz ultravioleta.

### III- Resultados

#### 1. Quantificação da HbA<sub>2</sub> e HbF e determinação qualitativa de variantes de Hb por HPLC de troca iónica

Em todas as amostras estudadas foi feita a quantificação da HbA<sub>2</sub> e HbF, assim como a determinação qualitativa e, quando presentes, quantitativa de variantes de Hb.

Mediante o resultado da quantificação da HbA<sub>2</sub> e da HbF, as amostras foram divididas em dois grupos:

**Grupo I** – 11 amostras que apresentavam variantes de Hb ou valores de HbA<sub>2</sub> e HbF superiores aos valores de referência (VR: HbA<sub>2</sub><3.5%; Hb F <2%).

**Grupo II** – 39 amostras que apresentavam doseamento de HbA<sub>2</sub> e HbF dentro dos valores de referência.

Tabela 17. Parâmetros hematológicos e resultado do estudo de Hbs das amostras do Grupo I.

ID	Sexo	Idade (anos)	Hb (g/dl)	VGM (fl)	HGM (pg)	Hb A <sub>2</sub> (%)	HbF (%)	Perfil de Hb	Resultado
I.1	F	23	13,0	72,1	23,2	4,0	2,1	AA <sub>2</sub>	β-tal
I.2	M	19	14,2	66,8	21,3	4,2	0,3	AA <sub>2</sub>	β-tal
I.3	F	39	13,5	61,9	20,3	5,2	0,6	AA <sub>2</sub>	β-tal
I.4	M	18	12,2	61,0	19,0	5,3	0,5	AA <sub>2</sub>	β-tal
I.5	M	19	13,6	75,0	25,0	3,9*	0,4	AS	HbS
I.6	F	33	12,4	69,0	23,0	3,9	0,7	AA <sub>2</sub>	β-tal
I.7	M	18	14,6	66,0	21,0	**	4,1	ALepore	HbLepore
I.8	M	49	15,5	69,0	22,0	**	2,8	ALepore	HbLepore
I.9	F	52	13,3	70,7	22,2	4,4	0,3	AA <sub>2</sub>	β-tal
I.10	F	26	14,3	74,1	23,4	4,1	0,7	AA <sub>2</sub>	β-tal
I.11	M	23	13,3	64,0	21,0	5,6	1,4	AA <sub>2</sub>	β-tal

\* - o valor de HbA<sub>2</sub> nos portadores de HbS está aumentado.

\*\* - a Hb Lepore é eluída com a HbA<sub>2</sub>, o valor apresentado corresponde às duas fracções.



Foram encontradas 8 amostras com valores de HbA<sub>2</sub> superiores aos valores de referência e sem variantes de Hb (Tabela 17), sendo portadores de  $\beta$ -talassémia ( $\beta$ -talassémia menor).

Foram ainda identificadas três portadores de variantes de hemoglobina (2 Hb Lepore e 1 HbS).

As causas de hipocromia e de microcitose das amostras pertencentes ao Grupo I, foram justificadas pela presença de  $\beta$ -talassémia ou de Hb Lepore em 10 das 11 amostras estudadas, pelo qual não foi necessário prosseguir o estudo.

A presença de HbS na amostra I.5 não justifica a hipocromia e microcitose apresentada pelo que o estudo desta amostra prosseguiu para pesquisa de  $\alpha$ -talassémia.

## 2. Pesquisa das mutações mais comuns por GAP-PCR multiplex

Todas as amostras pertencentes ao Grupo II e a amostra I.5 do Grupo I, foram testadas para as mutações  $\alpha$ -talassemia mais comuns por GAP-PCR multiplex [60].

13 amostras apresentaram as deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  sendo 10 de heterozigóticos para  $-\alpha^{3.7}$  ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ), 2 de heterozigóticos  $-\alpha^{4.2}$  ( $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ ) e uma de heterozigótico composto  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$  ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ ) (Tabela 18).

Figura 11. Resultados do GAP-PCR multiplex em gel de agarose a 1,5%. **1.** deleção 3.7 Kb em heterozigotia ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ). **2.** deleção de 4.2 Kb em heterozigotia ( $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ ). **3** normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ). **4** deleção 3.7 Kb em heterozigotia ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ). **5.** normal ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ). **6.** heterozigotia composta para as deleções de 3.7 e 4.2 Kb.

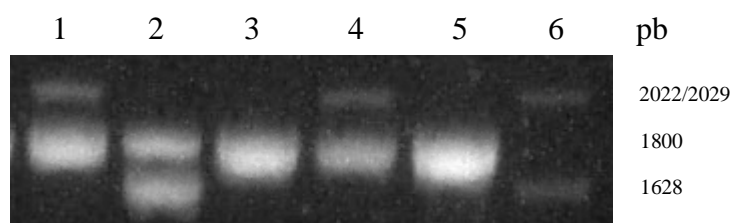


Tabela 18. Parâmetros hematológicos e resultados das 12 amostras pertencentes ao Grupo II que evidenciaram deleções mais comuns por GAP-PCR multiplex.

ID	Sexo	Idade (anos)	Hb (g/dl)	VGM (fl)	HGM (pg)	Hb A2 (%)	HbF (%)	Perfil de Hb	Genótipo
II.1	M	38	14,0	80,0	27,0	2,4	0,3	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$
II.2	F	26	12,6	79,0	27,0	2,3	0,1	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
II.3	M	27	14,5	80,2	26,0	3,2	0,2	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
II.4	F	57	13,5	81,1	26,0	2,8	0,1	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
II.5	F	40	14,6	78,0	25,0	2,5	0,2	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
II.6	F	24	14,6	75,0	25,0	2,4	0,5	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
II.7	M	28	15,2	77,0	24,0	2,4	0,1	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
II.8	F	35	13,6	67,9	23,0	2,5	0,4	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$
II.9	F	23	12,5	72,0	23,0	2,9	0,2	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
II.10	M	37	13,8	77,0	24,1	3,1	0,2	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$
II.11	F	47	13,2	77,0	24,3	3,1	0,3	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$
II.12	F	30	13,1	78,0	25,1	3,1	0,5	AA <sub>2</sub>	- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$

A amostra número I.5 do Grupo I para além de uma HbS evidenciou uma heterozigotia  $-\alpha^{3.7}$  quando testada por GAP-PCR multiplex.

As restantes amostras foram novamente divididas em dois grupos consoante os valores de HGM.

**Grupo III:** 15 indivíduos que apresentavam valor de HGM > 25,5 pg. O estudo destas amostras não foi continuado.

**Grupo IV:** 12 indivíduos com valor de HGM < 25,5pg. O seu estudo prosseguiu de modo a encontrar outras causas da hipocromia apresentada.

Tabela 19. Parâmetros hematológicos e resultado do perfil das hemoglobinas das amostras que pertencem ao Grupo III.

ID	Sexo	Idade (anos)	Hb (g/dl)	VGM (fl)	HGM (pg)	Hb A <sub>2</sub> (%)	HbF (%)	Perfil de Hb
III.1	F	47	14,1	79,0	26,6	2,5	0,3	AA <sub>2</sub>
III.2	F	27	13,1	79,6	25,7	3,1	0,1	AA <sub>2</sub>
III.3	M	18	16,4	77,3	27,4	2,8	0,2	AA <sub>2</sub>
III.4	M	48	15,1	80,2	26,3	3,0	0,2	AA <sub>2</sub>
III.5	M	37	14,4	80,0	27,0	3,2	0,4	AA <sub>2</sub>
III.6	F	30	12,6	78,0	26,0	3,1	0,2	AA <sub>2</sub>
III.7	M	29	16,1	80,0	26,0	3,1	0,1	AA <sub>2</sub>
III.8	M	45	14,6	81,0	27,0	2,6	0,3	AA <sub>2</sub>
III.9	M	60	15,6	81,0	26,0	2,8	0,3	AA <sub>2</sub>
III.10	M	31	15,4	78,1	26,0	2,6	0,1	AA <sub>2</sub>
III.11	F	22	14,7	79,0	26,0	2,9	0,5	AA <sub>2</sub>
III.12	M	33	14,9	80,2	26,4	2,7	0,1	AA <sub>2</sub>
III.13	M	26	16,3	81,0	26,0	2,7	0,2	AA <sub>2</sub>
III.14	M	27	14,1	78,0	26,0	2,8	0,3	AA <sub>2</sub>
III.15	F	39	13,9	79,0	26,0	2,7	0,3	AA <sub>2</sub>

Tabela 20. Parâmetros hematológicos e resultado do perfil das hemoglobinas das amostras que pertencem ao Grupo IV.

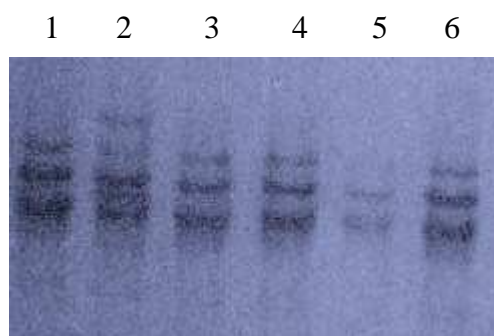
ID	Sexo	Idade (anos)	Hb (g/dl)	VGM (fl)	HGM (pg)	Hb A <sub>2</sub> (%)	HbF (%)	Perfil de Hb
IV.1	F	34	13,8	78,0	25,1	2,7	0,3	AA <sub>2</sub>
IV.2	M	40	14,6	79,4	25,4	2,5	0,1	AA <sub>2</sub>
IV.3	M	22	15,0	74,0	23,0	2,7	0,2	AA <sub>2</sub>
IV.4	M	26	15,3	78,0	25,0	2,8	0,4	AA <sub>2</sub>
IV.5	M	51	14,5	75,0	24,0	2,7	0,1	AA <sub>2</sub>
IV.6	M	44	13,7	78,8	25,1	2,6	0,2	AA <sub>2</sub>
IV.7	F	19	13,1	73,0	24,0	2,9	0,2	AA <sub>2</sub>
IV.8	F	29	12,2	69,0	21,0	2,6	0,2	AA <sub>2</sub>
IV.9	M	57	11,8	70,0	22,0	2,9	0,3	AA <sub>2</sub>
IV.10	M	18	14,3	77,0	25,0	2,7	0,2	AA <sub>2</sub>
IV.11	F	43	12,5	77,0	25,0	2,8	0,1	AA <sub>2</sub>
IV.12	F	29	12,9	78,0	25,0	2,5	0,2	AA <sub>2</sub>

### 3. Pesquisa de mutações mais comuns no gene $\beta$ por SSCP

Esta técnica foi utilizada principalmente para pesquisa da mutação pontual ( $\beta^+$  IVSI-6 T $\rightarrow$ C), a mutação mais frequente na região centro de Portugal e que por vezes apresenta valores de HbA<sub>2</sub> muito próximos do limite superior da normalidade. A metodologia usada, SSCP, permite também a pesquisa de outras mutações que possam ocorrer no mesmo fragmento, que engloba o exão 1 e regiões adjacentes do gene  $\beta$ -globínico.

A análise dos fragmentos por SSCP não detectou diferença de mobilidade compatível com a mutação  $\beta^+$  IVSI-6 T $\rightarrow$ C, nem foram detectados outros padrões de migração por comparação com um controlo normal para todas as amostras pertencentes ao grupo IV.

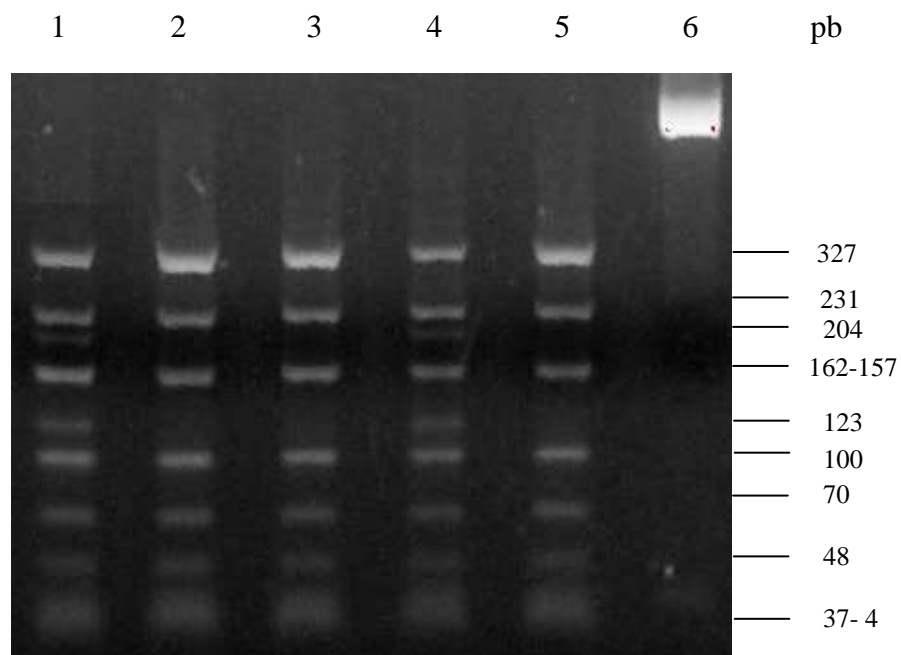
Figura 12. Resultados do SSCP para a pesquisa da mutação mais comum do gene  $\beta$  (IVSI-6). **1.** Controlo Negativo. **2.** Controlo Positivo (IVSI-6). **3.** Normal. **4.** Normal **5.** Normal. **6.** Normal.



### 4. Digestão de produtos de PCR com enzimas de restrição

Nos indivíduos pertencentes ao Grupo IV foi pesquisada a presença de Hb Plasencia ( $\alpha_{2125}$  Leu-Arg). A pesquisa desta variante foi feita por digestão de um fragmento amplificado por PCR do gene  $\alpha 2$  com a enzima de restrição MspI.

Figura 13. Resultados da digestão do produto PCR com a enzima de restrição MspI **1.** Portador de Hb Plasencia **2.** Normal. **3.** Normal. **4.** Controlo Positivo **5.** Controlo Negativo **6.** Não digerido. **pb.** Tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb)



Em 4 amostras foi detectado um padrão de migração compatível com a presença de um portador de Hb Plasencia, evidenciado pela co-existência dos fragmentos 204 e 123 pb juntamente com os fragmentos 327, 231, 162-157, 100, 70, 48, 37-4 pb.

Os parâmetros hematológicos dessas amostras estão descritos na Tabela 21.

Tabela 21. Parâmetros hematológicos das amostras pertencentes ao grupo IV portadores de Hb Plasencia.

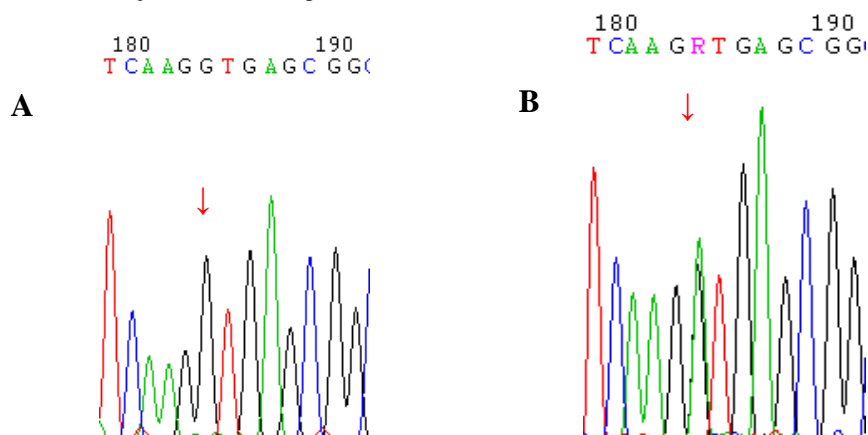
ID	Sexo	Idade	Hb (g/dl)	VGM (fl)	HGM (pg)	Hb A <sub>2</sub> (%)	HbF (%)	Genótipo
IV.3	M	22	15,0	74,0	23,0	2,7	0,2	Portador de Hb Plasencia
IV.4	M	26	15,3	78,0	25,0	2,8	0,4	Portador de Hb Plasencia
IV.5	M	51	14,5	75,0	24,0	2,7	0,1	Portador de Hb Plasencia
IV.7	F	19	13,1	73,0	24,0	2,9	0,2	Portador de Hb Plasencia

## 5. Pesquisa das mutações pontuais nos genes $\alpha$ globínicos por sequenciação

Nos indivíduos do Grupo IV em que não foram detectadas alterações pelas técnicas anteriores, procedeu-se à amplificação dos genes globínicos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  para a pesquisa de mutações pontuais por sequenciação.

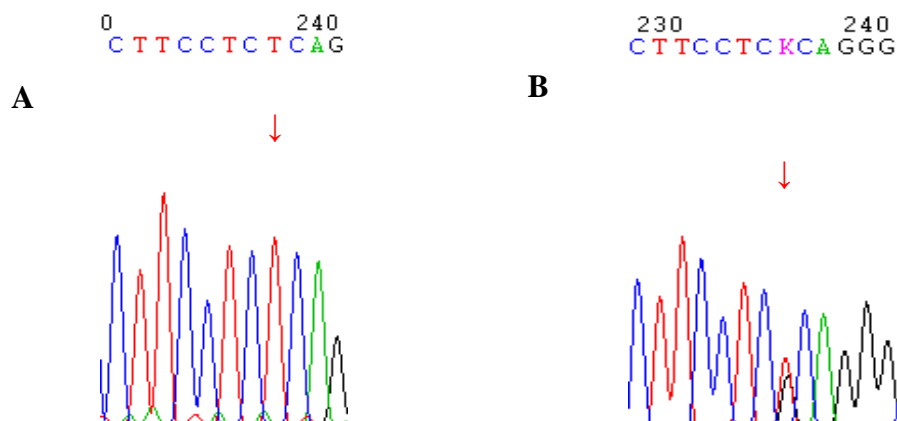
Na amostra IV.1 detectou-se uma mutação pontual em heterozigotia, uma troca do nucleotídeo glutamina por uma adenina, no primeiro nucleotídeo do segundo intrão (IVSII-1 G→A).

Figura 14. Representação parcial da sequência do gene  $\alpha 2$  da amostra IV.1. **A.** Controle Normal **B.** Amostra com a mutação em heterozigotia (G-A).



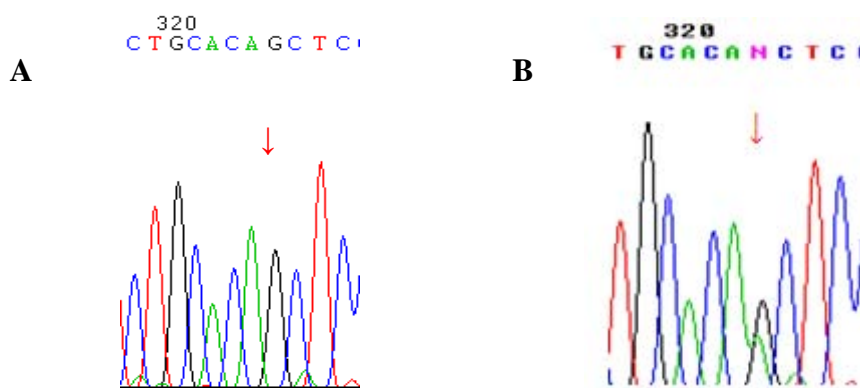
A amostra IV.2 evidenciou uma mutação pontual em heterozigotia, uma troca do nucleotídeo timina por uma glutamina a 55 pb do início do segundo intrão (IVSII-55 T→G).

Figura 15. Representação parcial do gene  $\alpha 2$  da amostra IV.2. **A.** Controle Normal. **B.** Amostra com a mutação em heterozigotia T-G.



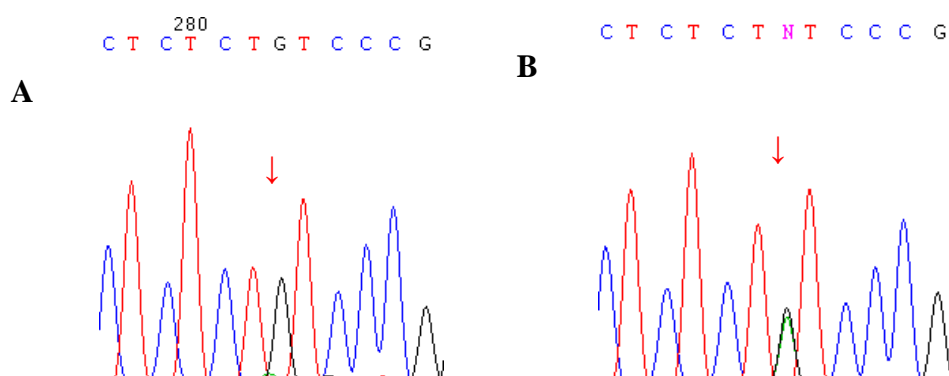
A amostra IV.9 evidenciou uma mutação em heterozigotia situada no último nucleotídeo do segundo intrão (IVSII-142 G→A).

Figura 16. Representação parcial da sequência do gene  $\alpha 2$  da amostra IV.9. **A.** Controle Normal **B.** Amostra com a mutação em heterozigotia (G-A).



A amostra IV.11 evidenciou uma mutação em heterozigotia situada a 42 pb depois do poliA. Representava uma troca de uma adenina por uma glutamina.

Figura 17. Representação parcial do gene  $\alpha 2$  da amostra IV.11. **A.** Controle Normal **B.** Paciente com a mutação em heterozigotia G-A.



Procedeu-se à confirmação das mutações IVSII-55 (T→G) e IVSII-142 (G→A) por digestão do produto de PCR utilizando enzimas de restrição.

Para a confirmação da mutação IVSII-55 (T→G) foi utilizada a enzima de restrição DdeI. A co-existência dos fragmentos 327, 278, 222, 105, 104, 92, 76, 72, 45 e 6pb, juntamente com a existência da banda 196 pb confirmam a presença da referida mutação.

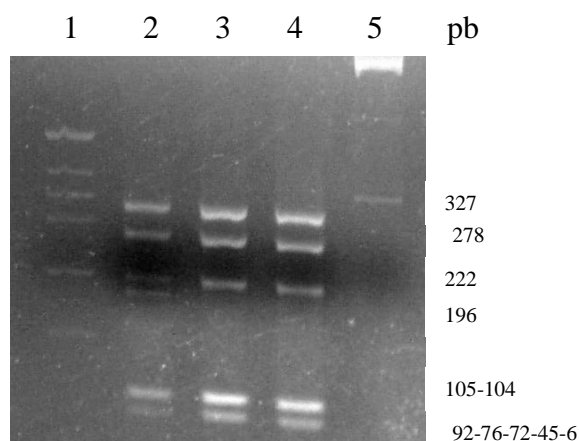


Figura 18. Resultados da digestão do produto PCR com a enzima de restrição DdeI **1.** Marcador de peso molecular pBR 322/Hinf I. **2.** IVSII-55. **3.** Normal. **4.** Normal **5.** Não digerido. **Pb.** Tamanho dos fragmentos em pares de bases.

Na confirmação da mutação IVSII-142 (G→A) utilizou-se a enzima de restrição AluI. A co-existência dos fragmentos 731, 195, 169, 130, 52, 48 juntamente com a existência da banda 299 confirmam a presença da referida mutação em heterozigotia.

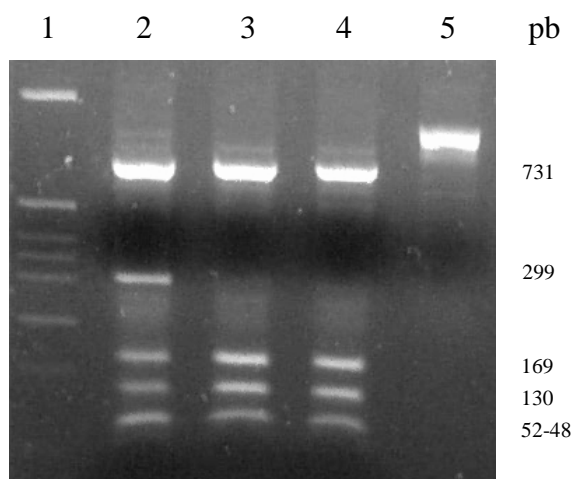


Figura 19. Resultados da digestão do produto PCR com a enzima de restrição AluI **1.** Marcador de peso molecular PBR 322/Hinf I. **2.** IVSII-142. **3.** Normal. **4.** Normal **5.** Não digerido. **Pb.** Tamanho dos fragmentos em pares de bases.



As mutações IVSII-1 (G→A) e poliA + 42pb (G→A) foram confirmadas por sequenciação com o primer reverso. Não puderam ser confirmadas por digestão com enzimas de restrição porque a mutação em causa não altera locais de corte para nenhuma das enzimas disponíveis.

Nos resultados obtidos por sequenciação verificou-se a presença de 4 mutações pontuais, todas elas situadas na parte não transcrita do gene  $\alpha 2$  (Tabela 22).

Tabela 22. Parâmetros hematológicos dos indivíduos que apresentaram mutações pontuais no gene  $\alpha 2$  por sequenciação.

ID	Sexo	Idade	Hb (g/dl)	VGM (fl)	HGM (pg)	HbA2 (%)	HbF (%)	Genótipo
IV.1	F	34	13,8	78,0	25,1	2,7	0,3	IVSII-1 G→A
IV.2	M	40	14,6	79,4	25,4	2,5	0,1	IVSII-55 T→G
IV.10	M	57	11,8	70	22	2,9	0,3	IVSII-142 G→A
IV.11	F	43	12,5	77	25	2,8	0,1	poliA +42 G→A

Em 4 amostras do Grupo IV não foi encontrada nenhuma mutação pontual nos genes globínicos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , nem no primeiro exão do gene globínico  $\beta$  que pudessem justificar os parâmetros hematológicos apresentados (Tabela 23).

Tabela 23. Parâmetros hematológicos dos 4 indivíduos em que não foram encontradas mutações

ID	Sexo	Idade	Hb (g/dl)	VGM (fl)	HGM (pg)	HbA2 (%)	HbF (%)
IV.6	M	44	13,7	78,8	25	2,6	0,2
IV.8	F	29	12,2	69	21	2,6	0,2
IV.10	M	18	14,3	77	25	2,7	0,2
IV.12	F	29	12,9	78	25	2,5	0,2

#### IV- Discussão

As causas mais comuns de anemia hipocrômica e microcítica são a anemia sideropénica e as  $\alpha$ - e  $\beta$ -talassémia.

A anemia sideropénica é uma anemia por carência de ferro e o seu diagnóstico pode ser feito pelo doseamento da ferritina.

Um doseamento aumentado de HbA<sub>2</sub> faz o diagnóstico de  $\beta$ -talassémia, justificando os parâmetros de HGM e VGM diminuídos.

Após exclusão de sideropénia e de  $\beta$ -talassémia, a causa mais frequente de anemia hipocrômica e microcítica é a  $\alpha$ -talassémia. O diagnóstico de  $\alpha$ -talassémia apenas pode ser feito por caracterização molecular; nalguns casos pode ser suspeitado pela presença de corpos de inclusão de Hb H.

No presente trabalho estudámos um grupo de 50 amostras de dadores do Centro Regional de Sangue de Coimbra, que apresentavam anemia hipocrômica e microcítica com valores de ferritina normal.

Numa primeira fase foi feito o estudo de hemoglobinas através da quantificação da HbA<sub>2</sub> e HbF e pesquisa de variantes de Hb. Foram encontradas 8 portadores de  $\beta$ -talassémia, 2 portadores de Hb Lepore (Hb híbrida  $\delta\beta$ ) e 1 portador de HbS ( $\beta_6$  Glu-Val).

Nas restantes amostras (39 amostras sem variantes de Hb e com valores de HbA<sub>2</sub> normal e 1 portador de HbS) foi pesquisada a presença das deleções associadas a  $\alpha$ -talassemia mais frequentes na nossa população (  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ ). Encontraram-se 10 deleções  $-\alpha^{3.7}$  em heterozigotia, 2 deleções  $-\alpha^{4.2}$  em heterozigotia e um heterozigótico composto  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ .

A distribuição dos valores de HGM e o tipo de deleção  $\alpha^+$  mais comum ocorreu de forma esperada. A deleção  $-\alpha^{3.7}$  foi a mais frequente com a presença em heterozigotia em 10 amostras. Apenas foram encontradas deleções em 4 amostras com valores hematológicos de HGM>25,5pg (VR:27-32pg).

Os 13 indivíduos portadores destas deleções (Tabela 18) apresentavam parâmetros hematológicos esperados para este tipo de mutações  $\alpha$ -talassémicas em heterozigotia. A amostra II.8, com genótipo de heterozigotia composta ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$ ) era a

que apresentava os parâmetros hematológicos mais severos, HGM de 23 pg e VGM de 67,9fl.

As restantes 27 amostras foram separadas em dois grupos, de acordo com o valor de HGM. Nesta divisão foi considerado o valor limite de HGM 25,5pg com base no trabalho de Mestrado “Caracterização molecular do gene  $\alpha$ -globínico em amostras hipocrômicas e microcíticas com HbA<sub>2</sub> normal” realizado pela Dra. Helena Vazão.

Nesse trabalho em 34 indivíduos com valores normais de HbA<sub>2</sub> e HbF e parâmetros hematológicos de HGM entre 25 - 27 pg e VGM entre 69 - 78fl, apenas foram encontradas as deleções  $-\alpha^{3,7}$  e  $-\alpha^{4,2}$  não tendo sido encontradas mutações pontuais nos genes das cadeias globínicas  $\alpha$  e  $\beta$ .

Com base nestes dados não achámos relevante prosseguir o estudo das 15 amostras pertencentes ao Grupo III que apresentavam valores hematológicos no limite inferior da normalidade com HGM 25,5-27pg.

No entanto, o aprofundamento do estudo molecular destes casos deverá ser realizado, nomeadamente o estudo de mutações pontuais no gene  $\alpha$  e no gene  $\beta$ , quando se pretende fazer aconselhamento genético, se o outro elemento do casal também apresentar uma hipocromia e microcitose ou for portador de uma variante de Hb.

O estudo das amostras pertencentes ao Grupo IV prosseguiu através da pesquisa de mutações pontuais no gene globínico  $\beta$ , para despiste da mutação  $\beta^+$  IVSI-6 (T-C) ou a presença de uma mutação  $\beta$ -talassémia associada a uma  $\delta$ -talassemia.

Não foi encontrada nenhuma diferença de mobilidade no SSCP do gene  $\beta$ -globínico, no entanto, apenas foi amplificado o primeiro exão e regiões adjacentes não ficando excluída a presença de outras mutações pontuais na restante sequência globínica  $\beta$ .

De seguida foi pesquisada a presença de Hb Plasencia, a variante de Hb  $\alpha$ -talassémica mais comum em Portugal, segundo a experiência do Laboratório de Anemias Congénitas e Hematologia Molecular do CHC (C.Bento, comunicação pessoal).

Verificou-se a presença de 4 portadores de Hb Plasencia. Estas amostras apresentavam valores de VGM entre 73 - 78 fl e de HGM entre 23 - 25pg (Tabela 21). A hemoglobina Plasencia foi descrita pela primeira vez em 2005 numa família espanhola residente em Plasencia associada a um fenótipo de hipocromia e microcitose

moderada [63]. Esta mutação deve-se a uma substituição no codão 125 no gene  $\alpha 2$  resultando numa substituição do aminoácido leucina por uma arginina (CTG-CGG). O aminoácido 125 está situado na região da hélice H da cadeia  $\alpha$ -globínica, um local crítico para o contacto das cadeias  $\alpha$ - $\beta$  e consequentemente formação do tetrâmero, originando um fenótipo  $\alpha^+$  por mecanismo pós-translacional [64].

Esta variante de Hb, foi a segunda mutação mais frequente encontrada no nosso grupo de amostras, o que nos permite concluir que deveriam ser feitos mais estudos da sua prevalência na nossa e noutras populações.

Excluídas as causas mais comuns de  $\alpha$  e  $\beta$ -talassémia procedeu-se à sequenciação dos genes globínicos  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ .

Foram encontrados 4 mutações em heterozigotia na parte não transcrita do gene  $\alpha 2$  (3 no segundo intrão do gene  $\alpha 2$  e uma 42 pb depois do polyA) descritas aqui pela primeira vez [68].

As mutações IVSII-1 (T→A) e IVSII-142 (G→A) devem-se respectivamente a uma alteração no primeiro e no último nucleotídeo do segundo intrão do gene  $\alpha 2$ . Esta mutação altera os nucleotídeos conservados do local de splicing.

A remoção dos intrões e ligação dos exões durante a transcrição do RNA (splicing) requer sequências nucleotídeas específicas nas junções entre os intrões e os exões, os dinucleotídeos GT no terminal 5' e AG no terminal 3', assim como, as sequências *consenso* envolventes. A sequência *consenso* 5' inclui os últimos três nucleotídeos do exão e os primeiros seis nucleotídeos do intrão, enquanto o local 3' inclui os últimos 10 nucleotídeos do intrão e o primeiro nucleótido do exão [29].

A presença destas duas mutações no local de splicing eliminam o normal processamento do RNA levando a que não haja síntese da respectiva cadeia. Como as mutações estão em heterozigotia o fenótipo provável será de  $\alpha$ -talassemia, o que está de acordo com os parâmetros hematológicos apresentados (Tabela 22).

As restantes 2 mutações encontradas [IVSII-55 (T→G) e uma 42pb depois do poliA (G→A)] estão descritas na parte não transcrita do gene  $\alpha 2$  e aparentemente não justificam os parâmetros hematológicos encontrados.

São poucas as mutações descritas na parte não transcrita dos genes  $\alpha$ -globínicos, contudo, há que realçar a existência no primeiro intrão do gene  $\alpha 2$  de uma mutação

(IVSI-55 G→A) com uma alteração do mesmo nucleotídeo na mesma posição. Esta mutação está descrita numa família de descendência Hindu com uma hipocromia e microcitose moderada e com um rácio de cadeias  $\alpha/\beta$  de 0,6 (VR: 0,9-1,1).

Em 4 das 12 amostras pertencentes ao Grupo IV não foram encontradas mutações que pudessem justificar as alterações hematológicas (Tabela 23).

Uma das amostras em que não foram encontradas mutações, a amostra IV.8, apresentava valores bastante baixos de VGM de 69fl e de HGM 21pg, muito sugestivo de talassemia, podendo dever-se a  $\delta+\beta$ -talassémia ou à presença de grandes deleções no cluster  $\alpha$ - ou  $\beta$ -globínico. As restantes três amostras apresentavam parâmetros, sobretudo de VGM, mais próximos dos limites normais.

De modo a clarificar a origem da hipocromia apresentada pelas quatro amostras, deverão ser realizados mais estudos moleculares, como a pesquisa de  $\delta+\beta$ -talassémia. Neste estudo, apenas foi amplificada a região que engloba o primeiro exão do gene  $\beta$ -globínico para a pesquisa da mutação mais frequente na nossa população ( $\beta^+$  IVSI-6). Deverá ser sequenciado todo o gene  $\beta$ -globínico para a pesquisa de outras mutações pontuais associadas a  $\beta$ -talassémia ou mutações “silenciosas”. No mediterrâneo a mutação  $\beta^{++}$  (-101 C-T) é relativamente frequente, os indivíduos heterozigóticos apresentam valores de HGM, VGM e HbA<sub>2</sub> muito próximos do normal [65].

Deverão também ser pesquisadas grandes deleções do cluster  $\alpha$  e do cluster  $\beta$  por Southern Blotting ou MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). As grandes deleções, do cluster  $\alpha$  ou do cluster  $\beta$  ( $\gamma\delta\beta$ -talassémias) apresentam valores de HbA<sub>2</sub> e HbF normais.

As  $\gamma\delta\beta$ -talassémias são deleções muito raras que resultam na perda total ou parcial do *cluster* globínico  $\beta$  e das suas regiões regulatórias. Em heterozigotia apresentam parâmetros hematológicos compatíveis com uma  $\beta^0$ -talassémia, com uma hipocromia e microcitose severa e níveis normais de HbA<sub>2</sub> e de HbF. Não está descrito nenhum caso em homozigotia [66] [67].

## V- Conclusão

No estudo de 50 amostras de dadores de sangue do Centro Regional de Sangue de Coimbra, foi possível identificar algumas das causas mais frequentes de hipocromia e microcitose descritas na nossa população, assim como, outras mutações raras não descritas anteriormente.

Embora a amostra estudada não seja significativa para tirar conclusões sobre a prevalência destas mutações na nossa população, podemos concluir, com base neste estudo, que as mutações que envolvem o *cluster*  $\alpha$  são mais frequentes do que as envolvem o *cluster* não- $\alpha$ . Por exemplo, só a deleção  $-\alpha^{3.7}$  apresentou uma prevalência igual a todas as outras mutações que envolvem o *cluster* não- $\alpha$  (8  $\beta$ -talassémias e 2 Hb Lepore).

O facto do diagnóstico definitivo de  $\alpha$ -talassémia apenas ser possível por técnicas de biologia molecular, torna-o mais dispendioso e moroso, em relação ao diagnóstico de  $\beta$ -talassémia, e a sua prevalência real não é conhecida.

O conhecimento das bases moleculares das amostras hipocrómicas e microcíticas, e a sua prevalência na população em estudo, apresenta grandes vantagens em termos de saúde pública, nomeadamente como meio de definir estratégias para diminuir o número de recém-nascidos afectados com formas graves, através de um apoio adequado às respectivas famílias em consultas de aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal.

## VI - Bibliografia

1. Wood WR (1993). Increased HbF in adult life. *Baillieres Clin.* 1993; 6(1) 177-213.
2. Efstratiadis A, Posakony JW, Maniatis T, Lawn RM, o'Connell C, Spritz RA, Deriel JK, Forget BG, Weissman SM, Slightom JL, Blechl AE, Smithies O, Baralle FE, Shoulders CC, Proudfoot NJ (1980). The structure and evolution of the human  $\beta$ -globin gene family. *Cell* 21:653.
3. Fritsh EF, Lawn RM, Maniatis T (1980) Molecular cloning and characterization of the human  $\beta$ -like globin gene cluster. *Cell* 19:959-972.
4. Huisman HJ (1993). The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *The Haemoglobinopathies*. Weatherall DJ, Higgs DR (Eds). Baillieres Clinical Haematology, vol.6, p1 WB Saunders Company, London.
5. Higgs DR (1993)  $\alpha$ -thalassemia. *Baillieres Clin Haematol* 6:117-150.
6. Hughes JR, Cheng JF, Ventress N, Prabhakar (2005). Annotation of cis regulatory element by identification, subclassification and function assesment of multispecies conserved sequences. *Proc Natl Acad USA* 102:9830-9835.
7. Weatherall DG, Clegg JB (2000). *The Thalassemia Syndromes*, 4<sup>th</sup>ed. Oxford, UK: Blackwell.
8. Foldi J, Cohen-Solal M, Valentine C, Blouquit Y, Hollan SR, Rosa J (1980). The human alpha globin gene the protein products of the duplicated gene are identical. *Eur J Biochem* 109:463.
9. Michelson AM, Orkin Sh (1983). Boundaries of gene conversion within the duplicated human  $\alpha$ -globin genes. Concerted evolution by segmental recombination. *J Biol Chem* 258:15245.
10. Higgs DR. (1993)  $\alpha$ -thalassemia. In *the Haemoglobinopathies*. Weatherall DJ, Higgs DR (Eds) *Bailiere's Clinical Haematology*, vol6, p117, WB Saunders Company. London.
11. Jarman AP, Nicholls RD, Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR (1986). Molecular characterization of a hypervariable region downstream of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *EMBO J*, 5:1857.
12. Higgs DR, Goodbourn SEY, Wainscoat JS (1981). Highly variable regions of DNA flank the human  $\alpha$ -globin genes. *Nucleic Acids Research* 9:4213.

13. Proudfoot NJ, Gil A, Maniatis T (1982). The structure of the human  $\zeta$ -globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. *Cell* 31:553.
14. Jarman AP, Higgs DR (1988). A new hypervariable marker for the  $\alpha$ -globin gene cluster. *Am J Hum Genet.* 42:8.
15. Higgs DR, Sharpe JÁ, Wood WG (1998) Understanding alpha globin gene expression: a step towards effective gene therapy. *Semin Hematol* 35:93-103.
16. Voon HPJ, Vadolas J. (2008) Controlling  $\alpha$ -globin: a review of  $\alpha$ -globin expression and its impact on  $\beta$ -thalassemia. *Haematologica* 2008; 93:1868-1876.
17. Sharpe JÁ, Chan-Thomas PS, Lida J, Ayyub H, Wood WG, Higgs DR (1992). Analysis of the human  $\alpha$ -globin upstream regulatory element (HS-40) in transgenic mice. *EMBO J* 1992, 11:4565-72.
18. Higgs DR, Wood WG, Jarman AP (1990). A major positive regulatory region located far upstream of the human  $\alpha$ -globin gene locus. *Genes and Development* 4:1588-1601.
19. Jarman AP, Wood WG, Sharpe JA (1991). Characterization of the major regulatory element upstream of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *Molecular and Cellular Biology* 11:4679-4689.
20. Higgs DR, Sharpe JÁ, Wood WG (1998). Understanding  $\alpha$  globin gene expression: a step towards effective gene therapy. *Semin Hematol*; 35:93-104.
21. Sharpe JÁ, Chan-Thomas PS, Lida J, Ayyub H, Wood WG, Higgs DR (1992). Analysis of the human  $\alpha$  globin upstream regulatory element (HS-40) in transgenic mice. *EMBO J* 11:4565-72.
22. Viprakasit V, Harteveld CL, Ayyub H, Stanley JS, Giordano PC, Wood WG (2006). A novel deletion causing  $\alpha$ -thalassemia clarifies the importance of the major human  $\alpha$  globin regulatory element. *Blood*; 107:3811-2.
23. Liebhaber SA, Cash FE, Ballas SK. (1986). Human  $\alpha$ -globin gene expression. The dominant role of the  $\alpha 2$ -locus in mRNA and protein synthesis. *J Biol Chem* 261:5327-33.
24. Albitar M, Cash FE, Peschle C, Liebhaber SA. (1992). Development switch in the relative expression of the  $\alpha 1$ -and  $\alpha 2$ -globin genes in humans and in transgenic mice. *Blood* 79:2471-4.
25. Cooley TB, Lee P (1927). A series of cases of splenomegaly in children and peculiar changes in bones; report of cases. *Am J Dis Child* 1927; 34:347–363.



26. Thein SL (2004). Genetic insights into the clinical diversity of  $\beta$ -thalassaemia. Br. J. Haemat., 124:264.
27. Thein SL (1993). B-Thalassaemia. In the Haemoglobinopathies. Weatherall, DJ, Higgs DR (Eds.). Bailliere's Clinical Haematology, vol.6, p. 151, W.B.Saunders Company. London.
28. Bento C, Rebelo U, Relvas L, Almeida H, Manco L, Pereira J, Cunha E, Branco A, Ribeiro ML. Red Blood Cell Disorders Diagnosis and Prevention. Experience of the Congenital Anemias Unit Hematology Department - Centro Hospitalar de Coimbra. European Conference on Rare Disease. Lisbon 2007. Poster.
29. Bunn, HF, Forget, BG (1986). Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. WB Saunders Company, Philadelphia.
30. Thein, SL (2004). Genetic insights into the clinical diversity of  $\beta$ -thalassemia. Br. J. Haemat. 122:264.
31. Celeste Bento (2007). Hemoglobinopatias Estratégia de Diagnóstico e Rastreio. Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Hematologia. SPH2007 49-50.
32. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM (1989) A review of the molecular genetics of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. Blood 73:1081-1104
33. De Angioletti M, Lacerra G, Castaldo C (1992)  $\alpha\alpha\alpha\alpha^{\text{anti 3.7 type II}}$ : a new  $\alpha$ -globin gene rearrangement suggesting that the  $\alpha$ -globin gene duplication could be caused by intra-chromosomal recombination. Human Genetics 89:37.
34. Kulozik A, Kar BC, Serjeant BE (1988)  $\alpha$ -Thalassemia in India: its interaction with sickle cell disease. Blood 71:467.
35. Lacerra G, Fioretti G, De Angioletti M (1971)  $\alpha^{5.3}$ : A novel  $\alpha^+$  thalassemic deletion with the breakpoint in the  $\alpha 2$ -globin gene and in close proximity to an Alu family repeat between the  $\psi\alpha_2$  and  $\psi\alpha_1$  globin gene. Blood 78:2740-2746
36. Zhao J-B, Zhao L, Fei Y-J (1991) A novel  $\alpha$ -thalassemia-2 (-2.7 kb) observed in a Chinese patient with HbH disease. American Journal of Hematology 38:248-249.
37. Harteveld C, Van Delft P, Wijermans P, Kappers-Klunne M, Weegenaar J, Losekoot M, Giordano P (2003). A novel 7.9 deletion causing  $\alpha^+$ -thalassemia in two independent families of Indian origin. Br. J. Haematol. 120:364.

38. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, Pretorius I-M, Jarman AP e Weatherall DJ (1989). A review of the molecular genetics of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *Blood*, 73:1081.
39. Bodwen DK, Hill AVS, Higgs DR, Oppenheimer SJ, Weatherall DJ, Clegg JB (1987). Different hematologic phenotypes are associated with the leftward mutation ( $-\alpha^{4.2}$ ) and rightward ( $-\alpha^{3.7}$ )  $\alpha^+$ -Thalassemia deletion. *J.Clin Invest*, 79:39.
40. Sharma RS, Yu V, Walters WAW (1979). Haemoglobin Bart's hydrops fetalis syndrome in an infant of Greek origin and prenatal diagnosis of alpha-thalassemia. *Medical Journal of Australia* 2:433.
41. Fischel-Ghodsian N, Higgs DR, Beyer EC (1987). Function of a new globin gene. *Nature*. 329:397.
42. Pressley I, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ (1980). Gene deletion in a thalassemia prove that the 5'  $\zeta$  is functional. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77:3586
43. Nicholls RD, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ (1985).  $\alpha^0$ -thalassemia due to recombination between the  $\alpha_1$ -globin gene and the Alu repeat. *Blood* 65:1434.
44. Pootrakul S, Wasi P, Na-Nakorn (1967). Haemoglobin Bart's hydrops foetalis in Thailand. *Annals of Human Genetics (Lond)* 30:293.
45. Weatherall DJ, Clegg JB Boon WH (1970). The haemoglobin constitution of infants with haemoglobin Bart's hydrops foetalis syndrome. *British journal of Haematology* 18:357.
46. Liang ST, Wong VCW, So WWK (1985). Homozygous  $\alpha$ -thalassemia: clinical presentation, diagnosis and management. A review of 46 cases. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 92:680.
47. Weatherall DJ, Clegg JB (1981) *The Thalassaemia syndromes*. Oxford: Blackwell Scientific.
48. Galanello R, Paglietti E, Melis MA, Giaga L, E Cao A (1984) Hemoglobin inclusion in heterozygous  $\alpha$ -thalassemia according to their  $\alpha$ -globin genotype. *Acta Haematol*. 72:34.
49. Liebhaber SA (1989). A-Thalassemia Hemoglobin. 13:685.
50. Dacie JV, Lewis SM (1975) *Practical Haematology* (Eds) New York, NY. Churchill Livingstone p141.
51. Bunn HF (2003). Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Eng J. Med*. 337:762.

52. Ribeiro ML, Cunha E, Gonçalves P, martin Núñez G, Fernandez Galan MA, Tamagnini GP, Smetamina NS, Gu LH, Huisman THJ (1997) Hb Lepore-Baltimore (delta<sup>68</sup>leu-beta<sup>68</sup>thr) and Hb Lepore-Washington-Boston (delta<sup>87</sup> Glu-beta IVS-II-8) in central Portugal and spanish Alta Extremadura. Hum. Genet 99:669.
53. Efremov GD (1978). Hemoglobin Lepore and anti-Lepore. Hemoglobin. 2:197.
54. Baglioni C (1962). The fusion of two peptides chains in Hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. Proc Natl Acad Sci. USA. 48:1880.
55. Martin G, Villegas A, González FA, Ropero P, Hojas R, Polo M, Mateo M, Salvador M, Benavente C (2005). A novel mutation of the alpha2-globin causing alpha(+)-thalassemia: Hb plasencia [alpha125(H8)Leu-Arg(alpha2). Hemoglobin 2005; 29(2):113-7.
56. Clegg JB, Weatherall Dj, Milner PF (1971) Hemoglobin Constant Spring- A chain termination mutant?. Nature. 234:337
57. Tamagnini G, Ribeiro ML, Valente V, Rasmachandram M, Wilson JB, Baysal E, gu LH, Huisman THJ (1991) Hb Coimbra or alpha2 beta 299 (g1) Asp-Glu, a new discovered high oxygen affinity variant hemoglobin 15:487.
58. Bento MC, Ribeiro ML, Cunha E, rebelo U, Granjo E, granado C, Tamagnini GP (2000). Hb Vila Real [beta36 (C2) Pro-His]: a new discovery high oxygen affinity variant.
59. Bento C, Relvas L, Vazão H, Campos J, Rebelo U, Ribeiro L (2006), The use of capillary blood samples in a large scale screening for the detection of  $\beta$ -thalassemias and hemoglobin variants. Haematologica, 91, 1563.
60. Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS (2001). A rapid and reliable 7-mutation multiplex polymerase chain reaction assay for  $\alpha$ -thalassemia. Blood 98:250.
61. Simplified Multiplex PCR Diagnosis of common Southeast Asian Deletional Determinants of  $\alpha$ -Thalassemia. Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, Higgs DR. Clin Chem 2000 Oct; 46(10): 1692-5).
62. Orita M, Iwahana H, Kanazawat H, Hayashi K, Sekiya T (1989). Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. Proc. Natd. Acad. Sci. 86:2766.
63. Martin G, Villegas A, González FA, Ropero P, Hojas R, Polo M, Mateo M, Salvador M, Benavente C. A novel mutation of the alpha2-globin causing

- alpha(+)-thalassemia: Hb plasencia [ $\alpha$ 125(H8)Leu-Arg( $\alpha$ 2) Hemoglobin 2005; 29(2):113-7.
64. Goosens M, Lee KY, Lieghaber SA, Kan YW (1982). Globin structural mutant  $\alpha^{125 \text{ Leu} \rightarrow \text{Pro}}$  is a novel cause of  $\alpha$ -thalassemia. *Nature*. 296:864.
  65. Maragoudaki, E., Kanavakis, E., Trager-Synodinos, J., Vrettou, C., Tzetis, M., Metxotou-Mavrommati, A. e Kattamis, C. (1999). Molecular, haematological and clinical studies of the -101 C  $\rightarrow$  T substitution in the  $\beta$ -globin gene promotor in 25  $\beta$ -thalassaemia intermedia patients and 45 heterozygotes. *Br. J. Haematol.*, **107**:699.
  66. Game L, Bergounioux J, Close JP, Marzouka BE, Thein SL (2003). A novel deletion causing (epsilon gamma delta beta) degrees thalassaemia in a Chilean family. *Br J Haematol*. 2003 Oct; 123(1):154-9.
  67. Rose C, Rossignol J, Lambilliotte A, Depret S, Le Metayer N, Pissard S (2009). A novel (epsilongammadeltabeta) (o)-thalassemia deletion associated with an alpha globin gene triplication leading to a severe transfusion dependent fetal thalassemic syndrome. *Haematologica*. 2009 Apr; 94(4):593-4.
  68. <http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/menu.html>